N° d'ordre
FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX
290

N° D'ENREGISTREMENT
DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
A.O.4480

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis DU PASQUIER

L'acquisition de la compétence immunologique chez les Vertébrés. Étude chez la larve du Crapaud accoucheur *Alytes obstetricans*.

TOME I : TEXTE

Soutenue le 11 juin 1970, devant la Commission d'Examen :

MM. R. CAMBAR, Professeur ..... *Président*

M. AVEL, Correspondant de l'Institut ...
A. BUSSARD, Chef du Service d'Immunologie cellulaire à l'Institut Pasteur, Directeur Scientifique au C.N.R.S. ... } *Examinateurs*
A. HAGET, Professeur .....
F. ANDRÉ, Professeur .....

— 1970 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547320_0002

N° d'ordre
FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX
290

N° D'ENREGISTREMENT
DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis DU PASQUIER

L'acquisition de la compétence immunologique chez les Vertébrés.
Étude chez la larve du Crapaud accoucheur *Alytes obstetricans*.

TOME I : TEXTE

Soutenue le *1970, devant la Commission d'Examen :*

MM. R. CAMBAR, Professeur ..... *Président*
M. AVEL, Correspondant de l'Institut ...
A. BUSSARD, Chef du Service d'Immunologie cellulaire à l'Institut Pasteur, Directeur Scientifique au C.N.R.S. ... *Examinateurs*
A. HAGET, Professeur .....
F. ANDRÉ, Professeur .....

— 1970 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITÉ
DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

351, COURS DE LA LIBÉRATION - TALENCE (GIRONDE)
TÉL. BORDEAUX (56) 92.92.81

Doyens honoraires : M. BRUS
M. CALAS

Doyen : M. VALADE

Professeurs honoraires :

M. KASTLER	Professeur à la Sorbonne
M. PISOT	Professeur à la Sorbonne
Mlle JOSIEN	Professeur à la Sorbonne
M. MILLOUX	
M. DANGEARD	
M. CAU	
M. GENEVOIS	
M. SCHOELLER	
M. AVEL	

Professeurs -

M. ROUSSET	Physique générale
M. ROGER	Mécanique rationnelle
M. WEILL	Anatomie comparée et embryogénie
M. DUFRESNOY	Mathématiques générales
M. LAFON	Physiologie générale
M. BOUNHIOL	Biologie animale
M. SERVANT	Physique
M. CALAS	Chimie organique
M. GAY	Cristallographie et minéralogie
M. PACAULT	Chimie physique
M. DAVID	Physiologie végétale
M. BLAIZOT	Physiologie de la nutrition
M. COLMEZ	Méthodes mathématiques de la physiqu
M. CAMBAR	Biologie animale
M. VIGNEAUX	Géologie
M. PANOUSE	Zoologie
M. ARZELIES	Physique (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
M. RIBEREAU-GAYON	Oenologie et chimie agricole
M. RISS	Mathématiques
M. GUIZONNIER	Physique
M. HAGET	Zoologie expérimentale
M. SEMIROT	Astronomie
M. CHASTEL	Physique nucléaire
M. HAGENMULLER	Chimie minérale
M. CREAC'H	Biologie animale
M. LOUDETTE	Mécanique physique
M. PATY	Chimie
M. BORDES	Préhistoire
M. SECHET	Botanique
M. BAGANAS	Mathématiques
M. VALENTIN	Radioélectricité

M. ENNOUCHI	Géologie
M. EYME	Botanique
M. RUAMPS	Physique électronique
M. FRAINNET	Chimie organique
M. HOARAU	Chimie physique
M. MARCHAND	Chimie
M. LALANDE	Chimie appliquée
M. GOTTIS	Géologie dynamique
M. LEMANCEAU	Chimie
M. CARDO	Psychophysiologie
M. ROCH	Physique
M. BELLON	Chimie (détaché à la Faculté des Sciences du Maroc)
M. CLASTRE	Cristallographie physique
M. JOUSSOT-DUBIEN	Chimie
M. VALADE	Chimie organique
M. SURDIN	Automatique
M. LABOUESSE	Biochimie
Mlle LAFFITTE	Physique
M. CLIN	Géologie
M. DESTRIAU	Chimie
M. BOTHOREL	Chimie
M. BLONDEL	Mathématiques
M. LASCOMBE	Chimie
M. RIMPAULT	Physique théorique
M. ANDRE	Zoologie et physiologie animale
M. SOURISSEAU	Chimie
M. LOCHET	Physique
M. VINDT	Biologie végétale
M. REGNIER	Mathématiques
M. PETIT	Physique corpusculaire
M. BARAUD	Chimie biologique
M. EMBERGER	Géologie
M. CHARRU	Physique
M. SIMONOFF	Chimie physique
M. BARETS	Biologie animale
M. PINEAU	Chimie
M. LEVEQUE	Géologie approfondie
M. BOUSSEAU	Physique
M. MENNRATH	Physique
M. BOUAS-LAURENT	Chimie organique
M. RIBEREAU-GAYON P.	Chimie oenologie
Mlle DUTRIEU	Physiologie animale
M. MOYES	Géologie
M. N.	Calcul infinitésimal
M. N.	Informatique
M. AUROUZE	Hydrogéologie

Maître de conférences honoraire -

M. DE PUYMALY

Maîtres de conférences -

Mme PETIT	Physique
M. BERNET	Génétique
M. FRESNEL	Mathématiques
M. LUTZ	Botanique
M. MOULINES	Chimie
M. POUCHARD	Chimie minérale
M. SARDOS	Physique
M. DUMERY	Mécanique
M. DRESS	Mathématiques
M. GARNIER	Biophysique
M. MENDES-FRANCE	Mathématiques
M. LESCA	Mathématiques
M. ARTOLA	Mathématiques
M. MARTINET	Mathématiques
M. BOUARD	Biologie végétale
M. MINNAERT	Physique théorique
M. ABGRALL	Physique théorique
M. BOISSEAU	Biologie générale
M. NASLAIN	Chimie minérale
M. ONILLON	Chimie minérale
M. HOGBE	Mathématiques
M. DAMEY	Mathématiques

Conseiller Administratif -

M. LLORENS.

AVANT - PROPOS

C'est à Monsieur le Professeur AVEL que je dois le passionnant sujet de cette thèse. Une fois de plus, sa clairvoyance lui a fait sentir l'intérêt fondamental d'un domaine de recherches encore peu exploré. Je ne saurais jamais assez lui témoigner la reconnaissance que je lui dois pour la formation qu'il m'a donnée au cours des sept années de recherches que j'ai passées dans son laboratoire. Je souhaite qu'il sente, malgré le caractère protocolaire de cet avant-propos, la chaleur de mes remerciements et ma profonde admiration.

Monsieur le Professeur CAMBAR, spécialiste du matériel sur lequel j'ai travaillé, a accepté la présidence de ce Jury. Il s'est toujours intéressé au déroulement de mes recherches, les facilitant à plusieurs reprises. Je le prie d'accepter mes remerciements les plus respectueux.

Depuis longtemps, Monsieur le Professeur HAGET se dévoue pour promouvoir l'Immunologie en Faculté des Sciences. J'ai souvent bénéficié de son aide et de ses encouragements. Il me fait l'honneur de juger ce travail. Je tiens à lui faire part ici de toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur ANDRE m'a toujours accueilli et conseillé avec bienveillance. La confiance qu'il m'a témoignée a été pour moi le meilleur des stimulants. Je le prie de trouver ici l'expression de mes remerciements les plus vifs.

Il m'est difficile de mesurer tout ce que je dois à M. A. BUSSARD, chef du Service d'Immunologie Cellulaire à l'Institut Pasteur, tant son dévouement et son amabilité ont été grands à mon égard. C'est à lui que je dois toute ma formation en immunologie. Après m'avoir maintes fois accueilli dans son laboratoire, m'avoir permis de participer à des stages fructueux, il m'a guidé dans mon travail à toutes les étapes de sa réalisation. Ses critiques, ses encouragements, sa patience, m'ont permis de mener à bien cette thèse. Je le remercie d'accepter de la juger, en espérant qu'un jour je pourrai m'acquitter de la dette de reconnaissance que j'ai contractée envers lui.

Monsieur le Docteur BIOZZI, de l'Hôpital Broussais, m'a aidé à appliquer à mon matériel ses techniques d'immunologie cellulaire et à en interpréter les résultats. Ses conseils avisés m'ont été précieux. Qu'il reçoive ici l'expression de mes chaleureux remerciements.

J'aimerais aussi remercier mes Maîtres qui, au cours de mes études, m'ont donné le goût de la recherche. Je tiens à remercier tout spécialement Monsieur le Professeur BARETS, dont le dynamisme a été pour moi un exemple.

Il m'est maintenant particulièrement agréable de remercier mon frère, Monsieur le Professeur DU PASQUIER, qui n'a ménagé ni ses critiques ni ses conseils lors de mon travail.

Monsieur CAZAUX a effectué une grande part de l'histologie nécessaire. Je l'en remercie bien vivement.

Madame TARDY et Madame DUPONT ont permis la réalisation matérielle de ce mémoire. Je les remercie sincèrement pour ce travail souvent ingrat qu'elles ont fait avec une égale bonne humeur.

Monsieur CARSALADE a assuré la réalisation de toute la partie photographique de ce travail avec une grande compétence. Je lui adresse mes sincères remerciements.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du Laboratoire de Zoologie et du Centre de Morphologie expérimentale du C.N.R.S. pour l'aide qu'ils m'ont apportée au cours de ces recherches.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I

HISTORIQUE

I.- TRAVAUX DE LA FIN DU XIXe SIECLE 3

II.- TRAVAUX DU XXe SIECLE 4
A - La Biologie des greffes 4
1°) Chez les Amphibiens adultes 4
a) Les Urodèles 4
b) Les Anoures 5
c) Les Apodes 6

2°) Chez les Amphibiens larvaires 6

B - Les autres réactions immunitaires chez les Amphibiens 8
1°) Chez les adultes 8
2°) Chez les larves d'Amphibiens 10

HISTORIQUE RESUME 11

CHAPITRE II

LE TETARD D'ALYTES OBSTETRICANS .
LE COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE ET LES PROTEINES SERIQUES - LEUR ONTOGENESE

A.- MATERIEL ET METHODES.

I.- L'ANIMAL 12

II.- TECHNIQUES D'ETUDE DU COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE 13
Techniques histologiques 13
1°) Coupes 13
2°) Frottis, empreintes 13

III.- TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES SERIQUES 14
A - Obtention du sérum 14
1°) Prélèvement du sang 14
2°) Coagulation 14

Pages

B - Analyse du sérum 15
1°) Analyses quantitatives 15
2°) Analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique 15
a) Etude des fractions électrophorétiques 15
b) Analyse immuno-électrophorétique 16

B.- LE COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE.

I.- LES ELEMENTS FIGURES DU SANG ET DU LIQUIDE PERITONEAL 19

II.- LES INFILTRATIONS TISSULAIRES ET LES FORMATIONS LYMPHO-MYELOIDES DELIMITEES 21
A - Dans le foie 21
B - Dans les reins 21
C - Dans le tube digestif 22
D - Au niveau des poumons, des branchies et du mésentère 22
E - Organes lymphoïdes indépendants 23
1) Le thymus 23
2) La rate 23

III.- RESUME ET CONCLUSION 24

C.- LES PROTEINES SERIQUES.

I.- RESULTATS QUANTITATIFS 25

II.- RESULTATS QUALITATIFS - PROTEINES SERIQUES 25

III.- PROTEINES DU LIQUIDE PERITONEAL 26

IV.- REMARQUE SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR L'ANALYSE IMMUNO-ELECTROPHORETIQUE 27

D.- ROLE DU THYMUS DANS L'ONTOGENESE DU COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE.

I.- TECHNIQUES DE THYMECTOMIE 28

II.- OBSERVATIONS VITALES DES ANIMAUX THYMECTOMISES 29

III.- ASPECTS CELLULAIRES ET HUMORAUX DES TROUBLES DUS A LA THYMECTOMIE 29
A - Les premières conséquences 29
B - Apparitions de foyers inflammatoires 30
C - Cachexie et mort 31
1) Etat cachectique 31
2) Au moment de la mort 32

IV.- INTERPRETATION ET DISCUSSION 32

E.- CONCLUSIONS DU CHAPITRE II 35

Pages

CHAPITRE III

DEFENSES NATURELLES
REPARTITION DES ANTIGENES

A.- MATERIEL ET METHODES.

I.- TECHNIQUES DE GREFFE ET D'IMMUNISATION 36
A - Les greffes 36
B - Techniques d'immunisation 37

II.- REPARTITION DES SUBSTANCES INJECTEES 37
A - Techniques d'observation après les greffes 37
B - Substances solubles 38
C - Cellules 38

B.- RESULTATS.

I.- EXISTENCE D'UN FACTEUR CYTOLYTIQUE NATUREL CHEZ LE TETARD D'ALYTES 39
A - Mise en évidence 39
B - Caractéristiques de cette activité cytolytique 40
C - Essais d'identification 40
D - Apparition du facteur hémolytique naturel au cours de l'ontogenèse 42
E - En résumé 43

II.- REPARTITION DES SUBSTANCES INJECTEES 43
A - Résultats à 22° C 43
1) Injections de cellules 43
2) Greffon 43
3) Substances solubles après une injection intrapéritonéale 44
4) Substances solubles après injection intracardiaque 45

B - Influence de la température, résultats à 4° C 45
1) Cas des hématies 45
2) Cas d'un greffon 45

III.- CONCLUSIONS ET RESUME 46
A - Reconnaissance des tissus autologues 46
B - Contacts avec le complexe lympho-myéloïde 46

Pages

CHAPITRE IV

ASPECTS CELLULAIRES ET HUMORAUX DE L'IMMUNITE SPECIFIQUEMENT ET ATIVEMENT ACQUISE CHEZ LA LARVE D'ALYTES

A.- TECHNIQUES.

I.- MISE EN EVIDENCE DE CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS 48
A - Sur du matériel vivant 48
1) Hémolyse locale (ou méthode des plages de lyse) 48
a) Principe de la méthode 49
b) Réalisation 49
2) Immuno-cyto-adhérence (I.C.A.).- Méthodes des rosettes 50
a) Principe 50
b) Réalisation 50

B - Sur du matériel fixé 51
1) Principe 51
a) Détection de globulines intracellulaires 51
b) Détection d'anticorps anti γ globulines de lapin 51
2) Réalisation 51
a) Matériel 51
b) Mode opératoire 52

II.- DETECTION D'ANTICORPS CIRCULANTS 53
A - Précipitation en gélose.- Double diffusion 53
1) Principe 54
2) Réalisation en tube. Double diffusion en tube 54
3) Réalisation sur plaque. Double diffusion sur plaque 54

B - Hémagglutination 55
1) Hémagglutination directe 55
2) Hémagglutination passive 55

C - Estimation du pouvoir d'hémolyse 55
1) Par dilutions successives 55
2) A concentration constante 55

B.- RESULTATS.

PREMIERE PARTIE : Analyse des réactions du têtard d'Alytes à l'égard d'antigènes provenant d'animaux phylogéniquement éloignés 57

Pages

I.- CINETIQUE DE LA REACTION ETABLIE PAR L'ETUDE DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS ANTI HEMATIES 57

A - Chez l'animal normal 57

B - Chez l'animal immunisé 58
1) Augmentation de la taille de la rate 58
2) Apparition dans la rate de cellules productrices d'anticorps .. 58
a) Détection par la méthode des plages de lyse 58
b) Détection par la méthode d'immuno-cyto-adhérence (I.C.A.) 59

II.- ANALYSE EXPERIMENTALE DES ASPECTS CELLULAIRES DE LA REPONSE IMMUNOLOGIQUE A L'EGARD DES HEMATIES 61

A - Influence du type d'hématie 61
B - Influence de la dose et de la voie d'injection 61
C - Spécificité de la réponse 62
D - Réponse à une seconde injection du même antigène 64

III.- ASPECT HUMORAL DE LA SYNTHESE D'ANTICORPS ANTI HEMATIES 65
A - Mise en évidence d'anticorps dans le sérum et le liquide péritonéal 65
B - Spécificité de l'augmentation du pouvoir hémolytique 65
C - Rôle du complément 66

IV.- SYNTHESE D'ANTICORPS CONTRE DES PROTEINES ETRANGERES 67
A - Recherche d'anticorps anti-sérum albumine bovine 67
B - Anticorps anti-protéines du sérum de lapin 67
1) Anticorps précipitants 67
2) Immunofluorescence 68

Résumé de la première partie 68

DEUXIEME PARTIE : Réaction d'immunité acquise contre les iso-antigènes 69

I.- APTITUDE DES TETARDS D'ALYTES OBSTETRICANS A SYNTHETISER DES ANTICORPS CONTRE DES PROTEINES ISOGENIQUES 69
A - Immunisation 69
B - Résultats 69
C - Spécificité de la réaction 70

Pages

II.- APTITUDE DES TETARDS A REJETER LES HOMOGREFFES 70

Comparaison entre autogreffes et homogreffes 71
1) Cas des autogreffes de tissu musculaire maintenues à 22°C 71
2) Cas des homogreffes de tissu musculaire faites à 22° C 71
3) Homogreffes de peau 72

RESUME DU CHAPITRE IV 72

CHAPITRE V

NATURE DES ANTICORPS ET DES CELLULES INTERVENANT DANS LES MECANISMES D'IMMUNITE ACQUISE. RECRUTEMENT DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

I.- NATURE DES ANTICORPS 73
A - Caractérisation des anticorps présents dans un immun-sérum hémolytique 73
B - Etude électrophorétique du sérum des animaux immunisés avec des protéines isogéniques ou porteurs d'une homogreffe 74
C - Action du sérum antiglobulines sur la formation des rosettes 75
D - Action du mercapto-éthanol sur la formation des plages de lyse 75

II.- NATURE DES CELLULES ACTIVES DANS LES REACTIONS IMMUNITAIRES 76
A - Les cellules productrices d'anticorps après une immunisation 76
1) Cellules productrices étudiées in vitro 76
2) Préparations fixées 76
a) Coloration des C.F.R. 76
b) Immunofluorescence 77
3) En résumé 77

B - Les cellules vectrices d'anticorps 77
1) Observation in vitro 78
2) Destruction par un sérum antiglobulines 78
3) Comparaison entre l'évolution de la protéinémie et l'apparition des rosettes dans le liquide péritonéal 78
4) En résumé 78

Pages

C - Le problème des C.F.R. et des C.F.P.naturelles 78
1) Cas des C.F.P. naturelles 79
2) Cas des C.F.R. naturelles 79
a) Morphologie 79
b) Comportement in vitro 79
c) Action du sérum anti globulines sur les C.F.R. naturelles 80
d) Fixation de plusieurs types de globules rouges sur la même cellule 81
e) Conclusion sur les cellules formant naturellement des rosettes (C.F.R. naturelles) 81

III.- MODE DE RECRUTEMENT DES CELLULES ACTIVES DANS LES REACTIONS IMMUNITAIRES 82

A - Augmentation du nombre absolu de cellules 82
1) Augmentation locale du nombre de cellules au site d'injection 82
a) Cas d'un greffon 82
b) Cas d'une injection 82
2) Multiplications cellulaires dans les centres du complexe lympho-myéloïde 83
a) Splénomégalie 83
b) Foyers de multiplication cellulaire dans le foie 83
c) Dans les autres organes 83
3) En résumé 83

B - Augmentation du taux de cellules productrices d'anticorps 83

IV.- RESUME ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE V 84

CHAPITRE VI

ONTOGENESE DE L'IMMUNITE.- APPARITION DES REACTIONS D'IMMUNITE ACQUISE AU COURS DE L'ONTOGENESE.

I.- PERIODE DE TOLERANCE AUX GREFFES ET D'INAPTITUDE A SYNTHETISER DES ANTICORPS 86

A - Tolérance aux homogreffes 87
B - Inaptitude à synthétiser des anticorps 87
C - Etat du complexe lympho-myéloïde chez ces animaux 87

II.- APPARITION DES REPONSES AUX STIMULI ANTIGENIQUES 87
A - Evolution du taux des C.F.R. naturelles au cours de l'ontogenèse de la rate 88
B - Effets des stimulations antigéniques au cours de l'ontogenèse 88

Pages

III.- ROLE DU THYMUS DANS L'ONTOGENESE DES RÉACTIONS D'IMMUNITE ACQUISE 90

A - Tolérance aux greffes chez les têtards thymectomisés 90

B - Production d'anticorps chez le têtard thymectomisé 91

1) Etude du taux de rosettes naturelles chez des têtards thymectomisés 91

2) Synthèse d'anticorps chez les animaux thymectomisés 92

a) Têtards immunisés avec des hématies humaines 92

b) Têtards immunisés avec des hématies de mouton 93

c) Conclusions et discussion sur l'influence de la thymectomie 93

3) Présence d'hémolysine naturelle chez les animaux thymectomisés 94

IV.- CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI 94

CHAPITRE VII

DISCUSSION GENERALE

I.- RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS 96

II.- LE PROBLEME DE L'ORIGINE DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.- HISTORIQUE 97

III.- DEGRE DE LA SPECIFICITE DES REPONSES D'IMMUNITE ACQUISE CHEZ LE TETARD 101

IV.- POTENTIALITE DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS 104

A - Les cellules productrices d'anticorps dérivent-elles de précurseurs prédéterminés à synthétiser un seul type d'anticorps ? 104

B - Nature des précurseurs des cellules productrices d'anticorps 106

C - Nature des cellules formant naturellement des rosettes (C.F.R. naturelles) 107

D - Augmentation du nombre des cellules productrices d'anticorps 108

CONCLUSION 113

BIBLIOGRAPHIE 114

INTRODUCTION

L'origine des cellules productrices d'anticorps chez les animaux supérieurs capables de réactions d'immunité activement acquise est l'un des problèmes fondamentaux qui se posent aux biologistes. En effet, il touche aux aspects les plus profonds de la biologie cellulaire, en particulier à ceux de la potentialité cellulaire, de l'induction, de la différenciation.

Le problème est né de l'étonnante spécificité des anticorps à l'égard des antigènes qui ont provoqué leur apparition. Le terme de spécificité tend à être employé dans des sens différents dans la littérature immunologique. Le terme s'applique ici aux anticorps et est utilisé pour rendre compte de leur aptitude à se combiner avec seulement un déterminant antigénique ou tout au plus avec une gamme étroite de déterminants antigéniques très voisins. Les antigènes étant très nombreux dans la nature, il résulte que les anticorps, qui sont,on le sait, produits par les cellules lymphoïdes, seront eux aussi très nombreux. Jusqu'à présent, l'aptitude qu'ont les cellules lymphoïdes à synthétiser une telle multitude d'anticorps différents n'a pas reçu d'explication satisfaisante. L'expérimentation, faite surtout chez les Mammifères, n'a pas encore permis de déterminer le vrai rôle de l'antigène et les potentialités des cellules actives, deux points essentiels pour la compréhension du problème.

A côté des expériences prometteuses de stimulation antigénique in vitro, actuellement effectuées dans plusieurs laboratoires, il nous a semblé utile d'aborder le problème de l'origine des cellules productrices d'anticorps en expérimentant sur un animal de petite taille, ne possédant qu'un petit nombre de cellules lymphoïdes. Nous avons choisi la larve du crapaud accoucheur, Alytes obstetricans, qui se prête aussi bien à une étude phylogénique qu'ontogénique de la question.

Le but poursuivi implique un travail préliminaire qui se déroulera de la façon suivante :

Après une étude historique des réponses immunitaires chez les Amphibiens, nous rapporterons d'abord une description des agents de ces réactions chez la larve d'Alyte : le complexe lympho-myéloïde et les protéines sériques.

Ensuite, on suivra la destinée d'une substance étrangère introduite dans l'organisme, ce qui conduira à envisager également les moyens de défense dits naturels (innés).

Il faudra faire ensuite l'analyse détaillée des réactions d'immunité activement acquise et de leur ontogenèse, analyse à la fois qualitative et quantitative qui servira de base à la discussion sur la question fondamentale qui nous préoccupe, l'origine des cellules productrices d'anticorps.

CHAPITRE II

HISTORIQUE

CHAPITRE II

HISTORIQUE

I.- TRAVAUX DE LA FIN DU XIXe SIECLE.

L'étude des réactions immunitaires chez les Amphibiens a été entreprise à la fin du XIXe siècle en Europe. En 1890, ERNST en Angleterre rapporte que la résistance de la grenouille aux maladies bactériennes est accrue si on augmente la température ambiante. L'aspect cellulaire de cette résistance est ensuite étudié par KOWALEWSKY en Russie (1893), HARDY en Angleterre (1894) et MESNIL en France (1895) à la suite des travaux de METCHNIKOFF (1884). MESNIL étudie plus particulièrement la réaction des grenouilles à l'inoculation du charbon, ainsi que la répartition des bacilles injectés à l'animal. Il remarque la forte concentration des microbes dans le foie et les reins et leur faible concentration dans la rate et la moelle osseuse. Ces microbes sont rapidement détruits dans le sang ou phagocytés. En 1897, WIDAL et SICCARD mettent en évidence une synthèse d'anticorps chez des grenouilles ayant reçu des injections de Salmonella typhi et maintenues à une température de 21° à 35° C. VER ECKE en 1899 étudie le comportement des grenouilles infectées par des microbes pathogènes. Il étudie même l'influence de la thymectomie et 63 ans avant MILLER obtient des résultats expérimentaux laissant supposer que le thymus joue un rôle important dans l'élaboration des mécanismes de défense immunologique. Il remarque en effet que les grenouilles thymectomisées résistent moins bien aux infections que les grenouilles normales. En particulier, lorsque dans un aquarium contenant des grenouilles thymoprives, l'une d'entre elles meurt, ses compagnes meurent aussi très vite. Au contraire lorsqu'une grenouille normale meurt dans un aquarium contenant des grenouilles entières, on ne constate pas de décès en chaîne. Les animaux privés de thymus résistent donc moins bien à une contamination par les produits de décomposition des animaux morts.

De ces travaux de la fin du XIXe siècle, on retire déjà de nombreuses notions importantes :

- Aptitude des grenouilles à donner des réponses d'immunité acquise,
- Influence de la température sur les réponses immunitaires,
- Importance de la phagocytose et rôle possible du thymus dans les processus immunitaires.

A partir du début du XXe siècle, les travaux vont se multiplier et il devient nécessaire de distinguer les différents domaines de recherche. Avant la seconde guerre mondiale, la plupart des travaux concernent la biologie des greffes. Nous passerons donc d'abord cette question en revue, avant celle de la production des anticorps.

II.- TRAVAUX DU XXe SIECLE.

A - LA BIOLOGIE DES GREFFES.

L'étude historique des travaux concernant la biologie des greffes est assez malaisée car beaucoup des résultats considérés ont été obtenus par des chercheurs qui utilisaient la greffe comme technique d'embryologie et qui ne considéraient que rarement les phénomènes de rejet sous leur aspect immunologique.

1°) Chez les Amphibiens adultes.

a) Les Urodèles. Jusqu'à une date récente, on pensait que les Urodèles n'étaient capables de rejeter que les hétérogreffes et non les homogreffes.

TAUBE en 1921, montre que l'homogreffe réussit entre individus de Triturus alpestris et que l'hétérogreffe de Triturus alpestris sur Triturus cristatus n'est pas suivie de rejet, bien que celle de Triturus alpestris sur Triturus salaratus échoue.

En 1926, COLLINS et ADOLPH notent le succès des autogreffes et des homogreffes chez la Salamandre Diemictylus viridescens. Cependant ces greffes sont accompagnées de modifications des mélanophores.

ANDERSON en 1932, compare l'aspect histologique d'auto - d'homo - et d'hétérogreffes de peau chez Triturus. HOROWITZ (1931) fait des observations analogues sur le même matériel, mais en pratiquant des greffes de muscles. Ces auteurs notent l'existence d'un lien entre l'intensité de la réaction lympho-fibroblastique et l'écart phylogénique qui sépare l'hôte du donneur. Ils remarquent l'intervention des granulocytes neutrophiles dans le cas des hétérogreffes.

Jusque là les résultats sont peu nombreux et assez flous. Il faudra attendre 1962 pour avoir des résultats plus précis.

ERICKSON (1962) étudie donc la biologie des homogreffes cutanées chez l'adulte de Triturus viridescens placé à 24° C. Il remarque ainsi que les homogreffes sont rejetées et qu'une deuxième greffe d'un même donneur sur un même hôte est rejetée plus rapidement que la première, quoique moins vite que chez les Mammifères. Alors qu'après une première greffe l'apparition de noyaux pycnotiques se produit en moyenne le 23e jour, la date de rejet d'une

seconde greffe varie entre 10 et 17 jours. Il ne note aucune réaction particulière imputable à un dimorphisme sexuel comme le pensaient FIZZARELLO et WOLSKY (1958, 1960) ou DE LANNEY (1961) chez Ambystoma mexicanum.

COHEN enfin en 1966 publie une étude détaillée du mécanisme de rejet des homogreffes cutanées chez Diemictylus viridescens. Il distingue deux phases dans la réaction :

1°) Une période de latence pouvant durer 16 jours, marquée par l'instauration d'une nouvelle circulation sanguine et l'épaississement du collagène dermique.

2°) Une phase de rejet avec infiltration leucocytaire et mort des mélanophores (28e au 40e jour). Cette réaction est spécifique des tissus du donneur, car une deuxième greffe d'un même donneur à un même receveur entraîne une réponse anamnestique dans 58% des cas. Il confirme également l'absence de dimorphisme sexuel. Il montre encore qu'à 10-15° C, les réactions sont affaiblies malgré la présence de lymphocytes dans le greffon.

En 1968, cet auteur étend ses recherches à plusieurs espèces : Ambystoma mexicanum, Taricha, Necturus et attribue l'accélération du phénomène de rejet observée dans les 2e greffes (sauf chez l'Axolotl) à un raccourcissement de la période de latence.

La même année, en collaboration avec HILDEMANN, il étudie des populations d'Amphibiens et analyse les gènes d'histocompatibilité en fonction de l'origine géographique des populations. Ils prouvent ainsi que la prétendue faiblesse des réponses immunologiques aux greffes chez les Urodèles n'est pas due à une carence du système immunitaire, mais à une diversité assez grande des gènes d'histocompatibilité dont aucun n'est comparable au locus H_2 des souris, ce qu'ils confirment en 1970.

b) Les Anoures. En 1918, SCHULTZ remarque qu'après une greffe cutanée de Bufo viridis sur Bufo vulgaris l'hôte meurt alors que la greffe réciproque réussit. ERDMAN en 1927 observe que les homogreffes chez l'adulte de Rana ne survivent que deux mois. Elle note également l'échec des hétérogreffes cutanées de Rana temporaria sur R. arvalis et de Hyla sur Rana. D'après ces premiers travaux, il semble se dégager une différence par rapport aux Urodèles, puisque l'échec des hétérogreffes est enregistré systématiquement et que les résultats des homogreffes ne sont pas constants. Chez les Anoures aussi, beaucoup des travaux consultés ne concernent pas directement le problème des greffes et sont, de ce fait, difficilement interprétables. C'est le cas en particulier des travaux de GASSUL qui rapporte le succès des transplantations chez Rana (1922). VOGEL en 1940 remarque pourtant que chez l'adulte de Rana pipiens le tissu greffé dans le cas d'une homogreffe est progressivement résorbé et remplacé par les tissus de l'hôte après 2 semaines.

Plus tard, en 1961, VYAZOV et SOROKINA parviennent à induire chez Rana temporaria la tolérance aux greffes cutanées de Rana arvalis en pratiquant auparavant une injection intrapéritonéale de broyat de peau aux larves de Rana temporaria.

En 1962, BUTLER, REES et ELEK rapportent l'échec de leurs tentatives d'homogreffes chez Xenopus et SIMNETT en 1965 remarque une fois de plus l'existence d'une influence de la température sur les réactions anti-greffes.

c) Les Apodes. COOPER et HERRERA en 1968 constatent l'intolérance chronique aux homogreffes cutanées des individus de Typhlonectes compressicauda. Le mot chronique s'applique aux réactions lentes de rejet par opposition aux réactions brutales qui se produisent chez les Vertébrés supérieurs.

Le petit nombre d'expériences rapportées chez les adultes d'Amphibiens s'explique par le fait que les greffes étaient pratiquées surtout par des embryologistes, c'est-à-dire sur des embryons ou des larves. C'est ce nouvel aspect que nous envisagerons maintenant.

2°) Chez les Amphibiens larvaires.

Les premières expériences sont, à notre connaissance, celles de BORN en 1897 qui pratique des parabioses entre les larves de divers Amphibiens. Il réussit des unions entre embryons de Rana esculenta et Rana arvalis ou entre Rana esculenta et Rana fusca, mais les chimères ne se métamorphosent presque jamais. Des troubles apparaissent généralement les 14e et 15e jours sous forme d'accidents de vascularisation et précèdent de peu la mort des parabiontes.

Les parabioses entre Anoures et Urodèles ne tiennent pas au-delà de deux jours. Les greffes croisées réussissent d'une manière différente sur chaque partenaire comme l'observera encore HARRISON (1924-1925) qui à la suite des travaux de BORN (1897) était parvenu à maintenir au-delà de la métamorphose des parabiontes de Rana viridescens et Rana palustris.

En 1962, Mlle HUCHON pratique également des parabioses entre diverses espèces d'Amphibiens et note tous les degrés possibles de l'intolérance totale (entre Pelobates cultripes et Discoglossus pictus) à la tolérance parfaite (entre individus de Discoglossus pictus).

Outre les parabioses, il faut signaler les greffes pratiquées chez les embryons et les larves. Nous ne signalerons que les expériences ayant un intérêt immunologique certain.

COLE en 1922 effectue des greffes de peau sur les yeux des têtards pour étudier les modifications de la peau et constate qu'entre têtards de Rana clamitans et de Rana catesbiana certaines greffes sont rejetées. Il analyse alors le phénomène de rejet et décrit des infiltrations leucocytaires et une modification des mélanophores dans le greffon.

HADORN en 1945 réalise des chimères viables entre Tritons, mais la métamorphose est marquée par une crise mortelle.

ROSSI en 1958 parvient à greffer des bourgeons caudaux de Triturus

taeniatus sur les membres postérieurs de Discoglossus pictus, alors que NORTANICOLA (1959) observe une incompatibilité larvaire aux greffes de membres postérieurs entre larves de Bufo vulgaris et Bufo viridis : au milieu du stade larvaire, après une période de développement normal, s'instaure une régression du greffon, signe d'incompatibilité.

En 1959, HILDEMANN et HAAS sont les premiers à étudier pour lui-même le phénomène de rejet des homogreffes cutanées chez les larves de Rana catesbiana . Ils constatent une intolérance générale à une première greffe dont le temps moyen de survie est de 12 jours. Ils notent surtout qu'une deuxième greffe d'un même donneur sur un même receveur est rejetée deux fois plus vite. Ce rejet accéléré d'une deuxième greffe est généralement spécifique des tissus de l'individu donneur quoique 14 secondes greffes sur 20 pratiquées avec un deuxième donneur différent aient subi un rejet accéléré. Ce résultat prouve à la fois la spécificité de la réponse immunologique et l'absence d'antigène d'histocompatibilité strictement individuels.

Cinq ans plus tard (1964-1965), VOLPE étudie le devenir des homogreffes de crête neurale chez Rana pipiens. Il remarque que 94% des transplantations effectuées chez l'embryon sont suivies de rejet chez la larve.

Par ailleurs, une 2ème greffe, cutanée cette fois, entre les mêmes individus parvenus à l'âge adulte, est suivie d'un rejet accéléré . Il constate un effet de dose sur l'avenir de la transplantation : la greffe d'une crête neurale entraîne chez l'adulte un rejet accéléré d'une seconde greffe, celle de deux crêtes provoque une tolérance chez l'adulte .

En 1970 il conclut que chez Rana pipiens il n'existe pas au cours du développement, de période "neutre" pendant laquelle l'animal apprend à reconnaître ses propres tissus.

DUPUY (1964) met en évidence une tolérance aux homogreffes entre larves de Discoglossus pictus issues d'un même élevage. Il remarque cependant que les homogreffes cutanées entre larves d'Alytes obstetricans sont rejetées avant le 30e jour, tandis que des hétérogreffes sont toujours éliminées avant le 10e jour. Il observe en outre que les homogreffes musculaires donnent lieu à une réaction plus violente, puisque même les homogreffes entre individus de Discoglossus pictus sont rejetées dans ce cas.

En 1964-1965 COOPER et HILDEMANN mettent en évidence le rôle du thymus dans l'établissement de la faculté de rejeter les homogreffes chez le têtard de Rana catesbiana . Ils observent des survies prolongées d'homogreffes cutanées pouvant atteindre 119 jours lorsque la thymectomie est parfaitement réussie et effectuée entre le 18e et le 64e jour après l'éclosion. C'est à la même époque et indépendamment que nous avons commencé nos expériences sur la larve d'Alytes obstetricans(1965).

En 1966, Mme BOVBJERG rapporte le rejet régulier des homogreffes de peau entre les têtards de Rana pipiens.

En 1967, HOUILLON montre que les greffes embryonnaires de peau d'Axolotl sont indéfiniment tolérées par le Pleurodèle et par le Triton alpestre, alors que l'Axolotl ne tolère pas les greffes réciproques.

CHARLEMAGNE en 1968 montre que l'ablation du thymus au début de la vie larvaire de Pleurodeles watlii provoque à l'état adulte une tolérance aux homogreffes cutanées.

De tous ces travaux, on retient beaucoup de mises en évidence et peu d'analyses du déterminisme des réactions. HILDEMANN pourtant en 1962 montre que les jeunes têtards sont tolérants aux homogreffes et constate que la capacité de les rejeter apparaît lorsque le nombre des lymphocytes est 10 fois plus important qu'aux stades où existe une tolérance. Ces résultats sont confirmés par HORTON (1969) chez Xenopus laevis.

En conclusion la biologie des greffesn'est qu'un aspect des réponses immunologiques des Amphibiens, mais elle permet de mettre en évidence l'existence d'un mécanisme perfectionné de reconnaissance du soi. En outre le problème de l'induction d'une tolérance immunologique aux greffes semble moins simple depuis 1965. VOLPE comme nous l'avons signalé a montré que les tissus greffés sont toujours immunogéniquesou tolérogéniques. L'effet produit est dû à la dose d'antigène utilisée.

Ces travaux sont confirmés par HORTON chez Xenopus laevis en 1969 et par TOURNEFIER dans le cas d'hétérogreffes cutanées chez plusieurs espèces d'Urodèles(1968).

L'effet de dose constaté par VOLPE permet de penser que bon nombre des résultats de tolérance obtenus jusqu'alors étaient dus à une surcharge antigénique.

B - LES AUTRES REACTIONS IMMUNITAIRES CHEZ LES AMPHIBIENS.

1) Chez les adultes. A la suite des travaux de WIDAL et SICCARD (1897) ALLEN et Mac DANIEL (1937) étudient la synthèse des anticorps chez les Vertébrés poïkilothermes et l'influence de la température sur cette synthèse. Ils remarquent que les grenouilles sont capables de synthétiser des hémolysines après une injection de globules rouges de mouton, pourvu qu'on les maintienne au-dessus de 22° C. Ces résultats sont confirmés par WOLLMAN (1938) et BISSET (1947). Ce dernier pense que deux mécanismes interviennent au cours de l'immunisation :

1°) L'acquisition de la potentialité de synthèse des anticorps.
2°) La production des anticorps.

BISSET pense que le 1er temps est indépendant de la température et que le 2e temps en est dépendant.

En 1968, GONZALEZ-GUSMAN met en évidence la synthèse d'anticorps anti-sérum de cheval et anti-Salmonella dans des histiocytes de grenouilles immunisées.

En 1960, TRNKA et FRANEK parviennent à immuniser des grenouilles avec des Brucella et à caractériser les anticorps dans les protéines sériques correspondant aux β et γ globulines de la grenouille. Par la technique d'ultracentrifugation, ils démontrent l'existence de protéines anticorps d'un poids moléculaire élevé (coefficient de sédimentation 19 unités Svedberg) qui les apparente aux Ig M de Mammifères (Immuno globulines Macroglobulines). Ils montrent que la réponse obtenue est spécifique des antigènes utilisés.

Cette spécificité est refusée aux anticorps de Vertébrés inférieurs par SIROTININ (1960) qui remarque que les anticorps de poissons immunisés avec du sérum de cheval précipitent aussi bien avec le sérum de cheval qu'avec celui du lapin. Ce phénomène peut cependant être dû à la présence d'antigènes communs dans ces deux sérums, comme cela avait été mis en évidence sur certains globules rouges par WOLLMAN (1938) qui étudiait la synthèse des anticorps chez la grenouille chilienne Calyptocephalus gayi. En fait il semble bien que les anticorps synthétisés par les Vertébrés inférieurs possèdent un degré de spécificité assez voisin de celui des Mammifères comme l'ont montré les expériences comparatives d'AMBROSIUS chez le lapin, la tortue, le silure (1967).

Précisant tous ces résultats, EVANS et HORTON en 1961 Montrent que des Bufo marinus placés à 25° C et immunisés avec un mélange d'antigène H de Salmonella typhi et de γ globuline de lapin produisent des précipitines pour la protéine de lapin et des agglutinines pour Salmonella après une courte période d'immunisation. Les agglutinines se trouvent dans la fraction qui migre le plus lentement lors d'une électrophorèse.

Ces résultats sont confirmés par BUTLER, REES et ELEK (1962) qui, d'autre part, ne parviennent pas à mettre en évidence de groupes sanguins chez Xenopus laevis.

KRUEGER et TWEDT sont les premiers en 1963 à envisager l'aspect cellulaire de la synthèse d'anticorps chez Rana pipiens. Ils peuvent observer la production d'anticorps in vitro par des cellules spléniques isolées et l'inhibition de leur production par les basses températures.

En 1964, chez Bufo marinus, EVANS et KENT détectent les cellules productrices d'anticorps anti albumine de boeuf par une méthode d'immunofluorescence. Ils ne parviennent à détecter d'anticorps dans les plasmocytes des formations lymphoïdes de l'animal que 18 jours après la stimulation primaire (1965).

C'est à DIENER et NOSSAL que revient le mérite de mettre en évidence, toujours chez Bufo marinus, l'existence de deux types d'anticorps (1966). Les uns sont sensibles à l'action du mercapto-éthanol et les autres résistants. Comme EVANS, KENT et ATTLEBERGER, ils notent la faiblesse sinon l'absence d'une réponse secondaire anamnestique. Par ailleurs, ces auteurs suivent la répartition de l'antigène dans l'organisme. Ils constatent que la structure particulière des centres lymphoïdes de Bufo marinus a pour conséquence une répartition de type diffus de l'antigène, à la différence de ce qu'on observe chez les Mammifères (ADA et col. 1967, GARVEY et col. 1966, NOSSAL et col. 1966).

A la même époque LEGLER et EVANS étudient l'activité complémentaire du sérum des Anoures et des Urodèles, qui rappelle beaucoup celle du sérum de cobaye.

Ce n'est qu'en 1967 que YI - CHUAN - CHING étend aux Urodèles l'étude de la synthèse des anticorps. Il montre que la réponse immunologique est plus faible chez l'Axolotl que chez les Anoures et observe un long moment de latence avant l'apparition des anticorps, et une action inhibitrice du froid sur la partie initiale de la réaction immunitaire.

COWDEN et col.(1968) apportent quelques informations sur l'ultrastructure des cellules productrices d'anticorps chez Bufo marinus, qui montrent une grande similitude avec celles des Mammifères.

Enfin, chez Xenopus en 1969, LYKAKYS met en évidence l'existence de deux types d'immunoglobulines connues chez les Mammifères, confirmant ainsi les travaux de TRNKA et de DIENER. On trouve chez cet Amphibien des anticorps de type Ig G (7 S) et Ig M (19 S).

MARCHALONIS (1968) suit l'apparition de ces types d'immunoglobulines au cours de l'immunisation de Rana catesbiana avec des bactériophages. Après une injection unique, il ne détecte que des anticorps de type Ig M au début de la réaction. Au fur et à mesure que le temps s'écoule, l'activité anticorps se trouve localisée dans les Ig G (7 S). Ce phénomène est bien connu chez les Mammifères. L'étude de la composition en amino acides de ces deux classes d'immunoglobulines montre qu'elles ressemblent à celles des Mammifères.

Nous disposons ainsi de nombreuses données sur l'adulte. Il n'en est malheureusement pas de même chez la larve.

2) Chez les larves d'Amphibiens. Peu de travaux ont été publiés sur la synthèse des anticorps chez les larves. BISSET, en 1947, injecte par voie intrapéritonéale des Pseudomonas fluorescens à des têtards de Rana temporaria et remarque une meilleure résistance des larves lorsqu'on les place à 20° C.

Il faut ensuite attendre 1963-1964, époque à laquelle COOPER, PINKERTON et HILDEMANN mettent en évidence l'aptitude des têtards de Rana catesbiana à synthétiser des anticorps circulants précipitants contre des protéines de poissons. Ils peuvent aussi obtenir une synthèse d'anticorps contre des protéines sériques de têtards de la même espèce, ce qui met en évidence l'existence d'iso-antigènes sur les protéines sériques de ces animaux. La thymectomie empêche de façon significative la synthèse des anticorps.

En 1968, après avoir étudié leur complexe lympho-myéloïde, COOPER immunise des têtards de Rana catesbiana contre l'albumine sérique bovine et remarque que cette synthèse est sous la dépendance d'organes lymphoïdes, les "lymph glands" dont l'ablation entraîne, comme celle du thymus, la suppression de la synthèse d'anticorps.

Malgré ces travaux, on constate qu'aucune étude quantitative ou qualitative complète n'a été consacrée aux réactions immunologiques des larves d'Amphibiens. Notre premier travail consistera donc en l'analyse détaillée de ces réactions, et tout d'abord, celle des agents de ces réactions : le complexe lympho-myéloïde et les protéines sériques.

Nous les étudierons principalement chez le têtard d'Alytes obstetricans.

HISTORIQUE RESUME

1890 - 1910.

Les Amphibiens adultes résistent aux infections bactériennes grâce au sang et aux phagocytes, pourvu qu'ils soient placés à une température assez élevée: 20 ° C . Le thymus paraît jouer un rôle dans cette résistance.

1910 - 1939.

Les Amphibiens adultes se comportent très différemment selon les cas à l'égard des greffes. On admet généralement que les Amphibiens tolèrent les homogreffes, malgré quelques résultats contradictoires, en particulier chez les larves. La synthèse d'anticorps est sous la dépendance de la température.

1945 - 1960.

Les Amphibiens, Anoures et Urodèles, même larvaires ne tolèrent ni les hétérogreffes, ni les homogreffes. Une deuxième greffe est rejetée plus vite si elle provient du même donneur. Les adultes peuvent synthétiser des anticorps dont la spécificité n'est pas absolument reconnue. Ces anticorps sont des γ et des β globulines.

1960 - 1969.

Le thymus régit l'établissement des mécanismes immunologiques chez les larves. Anoures et Urodèles peuvent synthétiser des anticorps. Les Anoures peuvent produire des immunoglobulines G et M (Ig G et Ig M de la nomenclature internationale) dont la structure en amino-acides rappelle celle des Mammifères. Les anticorps sont synthétisés par des cellules plasmocytaires. Le sérum d'Amphibien contient du complément. Les organes lymphoïdes sont différents de ceux des Mammifères. La synthèse d'anticorps se produit non seulement dans ces organes mais aussi dans les reins.

La tolérance aux greffes est inductible chez les Amphibiens, si on injecte chez la larve un broyat de greffon. Cependant l'induction de la tolérance est subordonnée à la dose d'antigène. Une forte dose injectée à un embryon provoquera la tolérance, alors qu'une faible dose sensibilisera au contraire l'animal.

CHAPITRE II

LE TETARD D'ALYTES OBSTETRICANS

LE COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE ET LES PROTEINES SERIQUES

LEUR ONTOGENESE

CHAPITRE II

LE TETARD D'ALYTES OBSTETRICANS

LE COMPLEXE LYMPHO - MYELOIDE ET LES PROTEINES SERIQUES

LEUR ONTOGENESE

A - MATERIEL ET METHODES.

I.- L'ANIMAL.

C'est la larve du crapaud accoucheur que l'on trouve facilement dans le sud-ouest de la France. La grande taille de ces têtards facilite les interventions chirurgicales. En outre, les animaux éclos de pontes tardives passent l'hiver sous forme de têtard, ce qui permet de disposer d'animaux toute l'année.

L'élevage en est aisé. Les animaux proviennent de quatre origines géographiques différentes, mais rapprochées (quelques kilomètres) et sont maintenus dans de grands aquariums (120 x 60 x 60 cm) situés dans une salle d'élevage fraîche (environ 18°). Ces aquariums contiennent des plantes aquatiques et des petits Crustacés (Daphnia et Cyclops). De cette façon, un équilibre biologique s'instaure ce qui évite de changer l'eau. Les têtards, végétariens, sont nourris avec de la salade cuite et des flocons d'avoine.

Les animaux d'expériences sont maintenus dans des cristallisoirs de 500 ml ou dans de petits aquariums (25 x 15 x 15 cm) et placés dans une étuve à température constante.

Les stades de développement ont été déterminés à l'aide de la table de CAMBAR et MARTIN (Pl. 1).

II.- TECHNIQUES d'ETUDE du COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE.

A - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.

1) Coupes. Les animaux ou les organes à étudier sont fixés au picro-formol cuprique de Bouin-Hollande et conservés dans l'alcool à 70°. Après inclusion dans la paraffine à 58° C les pièces sont coupées à 5, 7 ou 10 µ d'épaisseur.

Pour colorer les coupes, nous avons eu recours à plusieurs types de colorations polychromes dues à Masson.

a) Hémalun-érythrosine-safran : cette technique permet le repérage facile des granulocytes éosinophiles dont les granulations sont colorées en rose vif. Le safran colore le collagène en jaune et l'hémalun teinte les noyaux en violet. Cette coloration est utile pour l'étude des centres hématopoïétiques.

b) Hématoxyline-ponceau de xylidine - bleu d'aniline : l'hématoxyline colore les noyaux en noir, le ponceau est un colorant cytoplasmique rouge et le bleu d'aniline colore le collagène en bleu.

2) Frottis, empreintes. Des frottis de sang, de liquide péritonéal et des empreintes d'organes ont été réalisés pour observer les cellules isolées. A côté de la coloration classique de Giemsa nous avons employé deux types de coloration plus ou moins spécifiques des acides nucléiques.

a) Coloration de Brachet. Nous avons appliqué la méthode préconisée par GABE.

- Réactif : vert de méthyle - pyronine

Vert de méthyle	0,15 g
Pyronine	0,25 g
Phénol	0,50 g
Alcool à 95°	2,5 ml
Eau distillée	100 ml
Glycérine	20 ml

- Mode opératoire : Après une fixation au Bouin-Hollande, les préparations sont lavées à l'alcool. La coloration elle-même dure 2 à 5 mn. Après un rinçage à l'eau distillée, on déshydrate à l'alcool absolu et on monte au Baume du Canada. Cette coloration se conserve assez mal. On obtient des préparations durables en lutant les bords de la lamelle.

- Résultats : le noyau riche en acide désoxyribonucléique (ADN) est coloré en bleu vert tandis que le cytoplasme lorsqu'il est riche en acide ribonucléique (ARN) est coloré en rose.

b) Coloration à l'orangé d'acridine - Technique d'Anderson.

- Réactifs : orangé d'acridine (Gurr). Le colorant est dilué à 1 % dans l'eau distillée et conservé à 4° C. Au moment de l'emploi, la solution est diluée au 1/10 dans le tampon de Mac Ilvaine.

Tampon de Mac Ilvaine : Il se compose de deux solutions :

- Solution I : Phosphate disodique PO_4 H Na_2 2 H_2O à 35,6 p. 1.000
- Solution II : Acide citrique à 21,01 p. 1.000

On mélange les deux solutions à raison de 35,5 ml de solution I et 64,5 ml de solution II. Le mélange tampon ainsi obtenu a un pH de 3,8.

- Mode opératoire : on fixe la préparation pendant 5 mn dans l'alcool-éther ou l'alcool méthylique. Après rinçage dans le tampon de Mac Ilvaine, on colore pendant 4 mn dans une solution à 0,1 p. 1.000 d'orangé d'acridine. On lave et on monte au tampon glycériné.

- Observation : les préparations sont examinées en lumière ultraviolette avec un microscope Leitz Ortholux équipé d'une lampe à vapeur de mercure Osram HBO 200. Le système filtrant comprend un filtre d'excitation UG_1 de 2,5 mm d'épaisseur et un filtre d'arrêt gris. Dans ces conditions, le noyau des cellules est coloré en jaune vert et le cytoplasme, lorsqu'il est basophile et riche en ARN, présente une fluorescence rouge.

III.- TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES SERIQUES.

A - OBTENTION DU SERUM.

1°) Prélèvement du sang.

Matériel : des pipettes Pasteur à double effilure et siliconées pour retarder la coagulation du sang. Diamètre de l'effilure à son extrémité, environ 0,25 mm. Ciseaux, pinces fines.

Mode opératoire : un animal anesthésié 4 mn dans une solution de méthane sulfonate de tricaïne (MS 222 Sandoz) à 1 p. 1.000 est placé à sec, sous la loupe binoculaire. Après avoir fendu la peau au niveau du coeur, on incise le péricarde et on tire le coeur au dehors avec des pinces. Il faut alors le maintenir entre les deux mors de la pince sans pourtant arrêter ses battements. On introduit alors l'extrémité de la pipette dans le ventricule et aussitôt on desserre la pince. Le sang monte naturellement dans la pipette. On peut obtenir une plus grande quantité de sang en munissant la pipette d'un tube de caoutchouc et en aspirant avec la bouche pendant l'opération. Le volume de sang recueilli varie selon la taille des têtards. Pour un animal de 1 g, il est d'environ 70 µl. (Pl.8, fig. 1)

2°) Coagulation.

Le sang est recueilli dans un petit tube en verre non siliconé de 6 mm de diamètre où il repose 1 heure. Le caillot se forme. On recueille le

surnageant (environ 60% du volume initial) après centrifugation. Le sérum peut alors être conservé au congélateur (- 20° C).

B - ANALYSE DU SERUM.

1°) Analyses quantitatives.

Nous remercions bien vivement Monsieur le Professeur DULONG DE ROSNAY qui a effectué pour nous des dosages de protéines au moyen de la technique de Folin-Ciocalteu, particulièrement bien adaptée aux milieux contenant peu de protéines. Nous avons effectué personnellement plusieurs dosages selon la technique du biuret qui convient pour les sérums contenant au moins 10 g de protéines au litre.

2°) Analyses électrophorétique et immuno-électrophorétique.

a) Etude des fractions électrophorétiques.

1) Les tampons. Nous avons essayé un grand nombre de tampons : tampon de Michaelis au véronal sodé-acétate de soude à pH 8,6 ; tampon véronal - Hcl à pH 8,2 ; tampon de Durrum véronal - glycocolle, mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec le tampon Tris - EDTA - borate (T.E.B.), dont voici la formule :

Trishydroxyméthylaminométhane (tris)		60,5 g
Acide éthylène diamine tétracétique (EDTA)		6 g
Acide borique		4,6 g
Eau distillée	qsp	1.000 ml
pH 9,3	force ionique 0,08	

Ce tampon se conserve bien, et en cours d'utilisation ne provoque pas de dépôts aux électrodes. La séparation des protéines est excellente.

2) Supports et cuves. Nous avons employé le papier Schleicher et Schull 2043 a Mgl en bandes de 4 x 31 cm et l'acétate de cellulose (Cellogel Chemetron) en bandes de 2 x 17 cm.

L'acétate de cellulose, en bandes étroites, convient bien aux petites quantités de sérum.

3) Conditions de migration sur papier. Nous avons utilisé l'appareillage de Groulade qui consiste en une cuve à évaporation limitée. On dépose à l'aide d'une pipette 0,05 ml de sérum pur et on établit le courant entre les électrodes. La migration dure 18 h dans un champ électrique de 6,3 V/cm. Après la migration, les bandes sont séchées sous une lampe à rayonnement infrarouge à 80° C pendant 30 mn. Ce séchage fixe les protéines.

- Coloration des protéines.

. Amidoschwarz (Noir amide). Les bandes de papier, fixées, sont plongées dans une solution à 1% d'amidoschwarz (Merck) dans le méthanol acétique, pendant 20 mn, puis différenciées dans le méthanol acétique (2% d'acide acétique)

pendant plusieurs heures. La différenciation n'est jamais parfaite : un fond bleu persiste toujours. C'est la raison pour laquelle nous avons préféré employer le vert de Lissamine.

. Vert de Lissamine . Les bandes fixées sont colorées 10 mn dans une solution aqueuse à 0,3% de vert de Lissamine (Gurr) acétifiée par 15% d'acide acétique (Technique de CASPANI et MAGISTRETTI, 1954). La différenciation effectuée à l'aide d'eau acétifiée à 2% est excellente.

- Lecture des bandes : les bandes colorées sont imprégnées d'une solution d'huile de paraffine contenant 1% d' α bromonaphtalène. Ce mélange les rend translucides. Les bandes ainsi traitées sont enregistrées par le photomètre intégrateur de l'appareil Titromatic (Quéré - Antarès).

4) Conditions de migration sur Cellogel. Nous avons utilisé les cuves fabriquées par Spetelec. La quantité de sérum à déposer sur les bandes n'est que de 0,005 ml. Ceci permet de faire des analyses individuelles malgré le faible volume de sang recueilli chez chaque têtard. La migration dure 3 h dans un champ électrique de 7,5 V/cm.

- Coloration des protéines : les protéines sont colorées 5 mn dans une solution d'amidoschwarz. La différenciation est obtenue en plongeant les bandes dans la solution suivante :

Alcool méthylique	350 ml
Eau distillée	500 ml
Acide acétique	70 ml
Diacétone alcool	100 ml

Lorsque le fond est parfaitement clair, les bandes sont appliquées sur une plaque de verre et séchées à la lampe à rayonnement infrarouge. Ce séchage rend également les bandes transparentes. On peut alors obtenir directement le protéinogramme par passage au photomètre intégrateur.

Nota : Il ne faut pas attribuer une valeur trop grande aux mesures quantitatives effectuées par cette méthode colorimétrique, car les colorants employés ne saturent pas forcément tous les groupements NH_2 libres d'une même protéine. En outre, le nombre de groupements NH_2 n'est pas le même d'une protéine à l'autre et ceci provoque des artefacts. C'est ainsi que LEWIN et HILLON (1959) ont montré que la sérum albumine de Mammifère fixait 1,46 fois plus de colorant que la γ globuline.

b) Analyse immuno-électrophorétique.

Cette méthode (GRABAR et WILLIAMS) nous a permis d'obtenir des précisions supplémentaires . Nous l'avons beaucoup employée soit pour l'analyse du sérum normal, soit pour celle du sérum d'animaux traités ou opérés. C'est pourquoi nous détaillerons son application aux sérums d'Amphibiens adultes ou larvaires.

- Immunisation des lapins - Obtention des immunsérums.

Plusieurs modes d'immunisation ont été essayés.

- Immunisation sans adjuvant . Un lapin de 4 kg reçoit 50 mg d'antigène protéique de têtard sous forme de 3 injections sous-cutanées de 1 ml de sérum total, espacées chacune d'une semaine. Le lapin est saigné cinq jours après la dernière injection et son immunsérum est appelé IS_1.

- Immunisation avec adjuvants. Obtentions des IS 2, 3, 4, 5, 6. IS_2 : Un lapin de 4 kg reçoit 18 mg de protéines sériques en 5 injections sous-cutanées espacées de 8 jours chacune. Chaque injection consiste en 0,5 ml de sérum total émulsionné dans un volume égal d'adjuvant complet de Freund (Mérieux).

IS_3 : Un lapin de 5 kg reçoit 20 mg de protéines sériques en 3 injections sous-cutanées de 1 ml de sérum total de têtard émulsionné dans le même volume d'adjuvant complet de Freund. La 2e injection est effectuée 2 mois après la première et la 3e, 5 jours après la 2e. On prélève le sang 5 jours après la dernière injection.

IS_{4-5-6}: Ces immunsérums ont été obtenus chez le même lapin après des injections de rappel.

- Conditions d'électrophorèse.

- Tampons. Nous avons employé le tampon de Tisélius dont voici la formule :

Véronal sodé		23,8 g
Hcl N		34 ml (à ajouter lorsque le véronal est dissous)
Eau distillée	qsp	1.000 ml

pH 8,2 force ionique 0,05

- Support. Les électrophorèses sont faites sur des lames de microscope recouvertes de 3,5 ml de gélose ou mieux d'agarose tamponnée à la concentration finale de 1,5%. Le diamètre des puits de dépôt varie selon les besoins entre 2 et 5 mm. La largeur de la rigole centrale est de 2 mm.

- Migration . Elle dure 3 h 30 dans un champ électrique de 3,5 V/cm.

- Précipitation spécifique .

Après la migration on découpe entre les puits la rigole dans laquelle on verse l'immunsérum et on laisse les précipités apparaître pendant 8 jours à 2° C en chambre humide. Après un lavage de 7 jours dans une solution de Na Cl 0,15 M renouvelée chaque jour, les lames sont séchées à l'étuve.

Pour éviter des déchirements dans la gélose au cours du séchage, rigole et puits sont remplis d'eau distillée et la lame est entièrement recouverte de papier filtre humide. Les lames sont, une fois séchées, prêtes pour la coloration.

- Coloration.

Nous avons employé le noir amide, mais surtout l'azocarmin, préparé de la façon suivante :

Tampon acétate	1.000 ml
Colorant	1 g

Formule du tampon acétate :

acide acétique		60 ml
acétate de Na		13,6 g
eau distillée	qsp	1.000 ml

Les lames sont plongées 20 minutes dans cette solution, puis lavées dans de l'eau acétifiée à 1%. Cette méthode colore toutes les protéines de la même façon et nous avons eu recours à une coloration spécifique pour caractériser les lipoprotéines. La méthode décrite par URIEL est la suivante :

Coloration des lipides.

On sature 100 ml d'alcool éthylique à 60° avec du Noir Soudan à 37° C pendant 24 h en flacon bouché. Après filtration et au moment de l'emploi, on ajoute 0,05 ml de lessive de soude pour 30 ml de solution alcoolique de Noir Soudan. Les lames, parfaitement séchées, sont plongées dans le colorant, face contre le fond du récipient, pendant 4 à 6 h.

Après la coloration on lave deux fois les lames dans l'alcool à 50° et on sèche les préparations.

Double coloration : on colore d'abord les lipides, puis on soumet les lames à la coloration normale à l'azocarmin dont la couleur rouge contraste bien avec le bleu-noir du noir soudan.

B - LE COMPLEXE LYMPHO - MYELOIDE

"Le complexe lympho-myéloïde est la masse totale des tissus concernés dans la formation des cellules sanguines et aussi pour une grande part dans la formation des anticorps" (YOFFEY, 1960). Ainsi définie la notion de complexe lympho-myéloïde recouvre et élargit celle de système réticulo-histiocytaire, véritable organe diffus dont font partie toutes les cellules sessiles des tissus qui possèdent la propriété de fixer dans leur cytoplasme vivant des grains de carbone ou des colorants vitaux : les cellules sont celles du reticulum des organes hématopoïétiques et les cellules histiocytaires.

Il n'existe pas de moelle osseuse chez le têtard et les éléments qui sont qualifiés de "myéloïdes", c'est-à-dire principalement les leucocytes granulocytes sont étroitement associés avec les éléments lymphoïdes, comprenant les lymphocytes. Certains de ces organes lympho-myéloïdes sont à prédominance myéloïde, d'autres à prédominance lymphoïde.

Nous distinguerons trois formes sous lesquelles se présente ce complexe chez une larve d'Anoure.

- Les éléments figurés du sang et du liquide péritonéal.
- Les rassemblements cellulaires délimités à l'intérieur d'autres organes : foie, reins, intestin,œsophage, bronches, poumons, mésentère.
- Les organes indépendants : le thymus et la rate.

I.-LES ELEMENTS FIGURES DU SANG ET DU LIQUIDE PERITONEAL.

Les cellules sanguines et leur apparition au cours de l'ontogenèse ont fait l'objet d'un travail de HILDEMANN (1962) chez Rana catesbiana. Chez Alytes, animal considéré comme plus primitif, nous ne disposions pas d'étude semblable. Nous avons donc rapidement et sommairement étudié les différentes catégories de cellules.

Nous avons retrouvé dans le sang des têtards âgés de 45 jours les différentes catégories cellulaires connues chez les Vertébrés. D'une manière générale, ces cellules sont plus volumineuses que chez les Mammifères et sont présentes en nombre très variable.

Les analyses quantitatives que nous avons effectuées permettent d'avancer pour une larve parvenue au stade IV_{10} le chiffre moyen de 300.000 hématies et 8.000 leucocytes pour 1 µl de sang.

Parmi les leucocytes, nous distinguerons :

- Les lymphocytes (Pl. 2, fig. 1). Ils ressemblent beaucoup aux lymphocytes de Mammifère bien que de plus grande taille (entre 10 et 15 µ). Le cytoplasme, basophile, forme sur les préparations fixées une fine couronne autour du noyau. Ils peuvent émettre des pseudopodes, comme nous l'avons observé in vivo et in vitro.

- Les Monocytes (Pl. 2, fig. 2). Ces cellules de 15 µ de diamètre ont un noyau réniforme volumineux, excentré et un cytoplasme très peu basophile, plus abondant que celui des lymphocytes. Ils sont considérés comme la forme circulante des histiocytes. In vivo, ils sont difficiles à distinguer des lymphocytes, car dans le sang toutes les cellules véhiculées passivement ont une forme sphérique.

- Les granulocytes. Ces leucocytes contiennent dans leur cytoplasme des granulations plus ou moins volumineuses et présentent des affinités diverses pour les colorants.

. Les éosinophiles (Pl. 2, fig. 3). Leurs granules sont beaucoup plus gros et moins nombreux que chez les éosinophiles de Mammifère. Leur noyau est réniforme et excentré. Les granules, comme le nom de la cellule l'indique, sont colorables en rose vif par l'éosine ou l'érythrosine. In vivo, ces cellules sont bien reconnaissables à leur aspect de mûre.

. Les basophiles (Pl. 2, fig. 4). Leurs granules sont plus petits et plus nombreux que ceux des éosinophiles. Le noyau est identique à celui de ces derniers. Le moindre choc produit leur éclatement et sur les frottis les images de basophiles entiers sont difficiles à observer. Les granules sont colorés en bleu violet par le Giemsa. In vitro, ces cellules sont facilement repérées, surtout lorsqu'elles éclatent. On assiste alors instantanément à la solubilisation des granules qui se dispersent autour de la cellule.

. Les neutrophiles (Pl. 2, fig. 5) ou hétérophiles. Leurs granulations sont très fines et réparties irrégulièrement dans le cytoplasme. Le Giemsa donne à leur ensemble une coloration mauve rosée claire. Le noyau est lobé et très polymorphe.

In vitro et in vivo, en phase liquide, ces cellules sont sphériques et sont difficiles à distinguer des lymphocytes et des monocytes.

Dans le liquide péritonéal, on retrouve ces formes de leucocytes accompagnées par de nombreux macrophages. Ces cellules de grande taille (15 - 20 µ) sont libres. Elles proviennent vraisemblablement des nodules lympho-myéloïdes mésentériques dont il sera question dans le paragraphe suivant.

Elles émettent des pseudopodes et adhèrent facilement au verre. Leur aspect in vivo est toujours plus ou moins sphérique.

Après fixation et coloration, elles ont les formes les plus variées. Leur noyau de grande taille a une chromatine moins dense que celle des lymphocytes. Le cytoplasme, abondant, est riche en inclusions et contient fréquemment des éléments phagocytés. Le nombre de cellules dans le liquide péritonéal normal est lui aussi très variable et compris entre 600 et 2.000 / µl.

II.- LES INFILTRATIONS TISSULAIRES ET LES FORMATIONS LYMPHO - MYELOIDES DELIMITEES.

A - DANS LE FOIE.

Comme tout Vertébré à un stade très jeune, le têtard d'Alyte possède un foie riche en tissu lympho-myéloïde. Ce tissu découvert chez les Urodèles en 1924 par JORDAN et SPEIDEL consiste principalement en une couche cellulaire située sous la capsule conjonctive du foie (Pl. 2, fig. 6).

Nous avons également remarqué des zones hématopoïétiques autour des vaisseaux sanguins intrahépatiques. La région sous-capsulaire nous a paru essentiellement granulocytopoïétique à la différence des zones périvasculaires, surtout lymphocytopoïétiques.

Organe volumineux, le foie est un gros producteur de cellules sanguines dans l'organisme du têtard. Il contient également dans la paroi des sinus veineux, des cellules histiocytaires dont le rôle macrophage est analogue à celui des cellules de Küpfer du foie de Mammifère. Comme l'a remarqué MESNIL (1895) chez l'adulte de Rana temporaria, beaucoup de ces cellules sont naturellement pigmentées.

Le rôle hématopoïétique du foie est temporaire chez Alytes. A partir des stades IV_{15-16} avant l'apparition des pattes antérieures, on assiste à une disparition rapide par nécrose des formations hématopoïétiques périphériques et périvasculaires (Pl. 2, fig. 7). C'est à cette époque que la rate acquiert son rôle hématopoïétique et où elle prend son aspect globuleux définitif et sa couleur rouge.

B - DANS LES REINS.

Le tissu intertubulaire du pronéphros et du mésonéphros renferme de nombreuses cellules lymphoïdes et des érythroblastes, ainsi que tous les types de granulocytes (Pl. 2, fig. 8).

Lors de la régression du pronéphros au cours de la métamorphose, il semble que les seuls éléments qui persistent soient précisément les cellules lympho-myéloïdes.

Ce détail présente un intérêt phylogénique. En effet COOPER (1967) a récemment décrit chez le têtard de Rana catesbiana une formation lymphoïde larvaire située exactement à l'emplacement du pronéphros. Nous ne serions pas surpris s'il s'agissait d'un organe lympho-myéloïde issu des éléments du pronéphros et qui se serait différencié en organe lymphoïde, plus précocement que chez Alytes.

C - DANS LE TUBE DIGESTIF.

Tout au long du tube digestif, de l'œsophage à l'intestin, nous avons pu observer des formations lymphoïdes nombreuses situées contre l'épithélium du tube digestif.

Les formations intestinales, assimilables à de petits nodules lymphoïdes ont environ 300 µ de diamètre et 100 µ d'épaisseur. Leur vascularisation est assurée par des capillaires situés généralement à la base du nodule (Pl. 2, fig. 9), tout contre l'épithélium du tube digestif. On peut les considérer comme l'équivalent des plaques de Peyer des Vertébrés supérieurs.

L'œsophage présente dans sa partie antérieure et dorsale un important organe lymphoïde dont la taille varie entre 100 et 450 µ de diamètre. Il est situé entre les muscles œsophagiens et l'épithélium œsophagien (Pl. 2, fig. 10). D'un point de vue phylogénique, cet organe peut être considéré comme un intermédiaire entre le volumineux organe de Leydig des Sélaciens et les tonsilles œsophagiennes des Vertébrés supérieurs.

Le contenu de ces organes associés au tube digestif est essentiellement lymphoïde, mais comme dans toutes les formations lympho-myéloïdes du têtard, on y distingue toujours des granulocytes. Les figures de mitoses y sont nombreuses et leur rôle lympho-cytopoïétique ne semble pas douteux.

D - AU NIVEAU DES POUMONS, DES BRANCHIES ET DU MESENTERE.

A l'extrémité des poumons embryonnaires et dans le tissu branchial nous avons décelé des formations lympho-myéloïdes d'aspect principalement myéloïde (granulocytes). Ces amas cellulaires n'ont pas de structure bien définie. Dans le cas des nodules pulmonaires et branchiaux, on décèle une fine membrane conjonctive entourant l'amas cellulaire. Leur position n'est pas fixe dans les branchies, on peut même en rencontrer jusqu'au-dessus de la cavité buccale. Ces organes renferment beaucoup de macrophages et de granulocytes. Leur vascularisation est très peu développée et ces formations semblent assurer plutôt une défense locale qu'une hématopoïèse importante et constante.

Dans le mésentère, il semble que les formations observées (Pl. 2, fig. 11) soient à l'origine des cellules libres du liquide péritonéal : des figures de mitoses y sont visibles. Il semble d'après les résultats connus chez les Urodèles (DANTSCHAKOFF et SEIDLER, 1922; JORDAN et SPEIDEL, 1924; CHIAKULAS et SCHEVING, 1964) que l'on puisse considérer ce tissu mésentérique hématopoïétique comme l'équivalent de la couche granulocytopoïétique sous-capsulaire du foie.

E - ORGANES LYMPHOIDES INDEPENDANTS.

1) Le thymus.

On connaît assez bien le thymus des Anoures adultes grâce aux travaux de KAPA chez Rana ridibunda, Rana esculenta et Bombina bombina (1963); chez les larves, on ne connaît que le thymus des têtards de Rana catesbiana (COOPER, 1967). Voici nos observations (1965) chez le têtard d'Alytes obstetricans.

Le thymus est un organe double, bilatéral, situé entre l'oeil et l'oreille (Pl. 3, fig. 3). C'est le premier organe lymphoïde qui se développe, formé à partir d'une ébauche épithéliale issue de la deuxième fente branchiale.

On distingue de la périphérie vers le centre : une fine membrane conjonctive qui envoie de nombreuses ramifications à l' intérieur de l'organe, une zone corticale contenant la plus grande partie des lymphocytes thymiques et des cellules de type épithélial à noyau polymorphe et à chromatine peu dense. La région médullaire, qui ne se distingue pas chez tous les animaux, est constituée de cellules formant un important réseau dans lequel s'insèrent encore quelques thymocytes. Des formations, à structure confuse et possédant un corpuscule hyalin central peuvent être assimilées sans trop d'invraisemblance aux corpuscules de Hassal des Vertébrés supérieurs.

Les lymphocytes sont de taille variée (Pl. 3, fig. 4) et se multiplient activement, surtout à la périphérie de l'organe.

Le thymus est vascularisé par des capillaires qui sont bien visibles à leur entrée dans la capsule conjonctive. Ils suivent parfois les travées conjonctives qui découpent l'organe en lobules, et deviennent difficilement observables au centre de l'organe où on les repère grâce aux volumineuses hématies qu'ils contiennent.

Comme chez les Vertébrés supérieurs, le cortex est important et prolifère surtout chez la larve jeune. Chez l'adulte et même chez la larve proche de la métamorphose (stade IV_{16}) le cortex est beaucoup moins épais.

2) La rate.

Aux stades que nous avons utilisés pour nos expériences la rate des têtards ne forme pas d'hématies. Sa couleur est d'ailleurs blanche et l'organe contient surtout des lymphocytes et quelques cellules pigmentées solidaires du stroma réticulé de l'organe et à rôle phagocytaire.

Sa structure est simple : elle est entourée d'une mince enveloppe conjonctive. A la périphérie de l'organe on rencontre une pulpe très vascularisée, alors que le centre est occupé presque exclusivement par des lymphocytes et des lymphoblastes. Les mitoses sont beaucoup moins nombreuses que dans le thymus (Pl. 3, fig. 1). Les cellules lymphoïdes se rencontrent au milieu d'un stroma réticulé dont les cellules ont un noyau clair et allongé très différent de celui des lymphocytes (Pl. 3, fig. 2). La rate est surtout lympho-

cytopoïétique et faiblement granulocytopoïétique. Elle a une taille très variable même chez des individus provenant d'un même élevage et parvenus au même stade de maturité. Nous reviendrons sur les causes possibles de ces variations de taille.

Nous avons compté les cellules lymphoïdes libérées après dilacération complète de l'organe dans un milieu de culture. Au stade IV_8 ce nombre peut varier de 7.000 à 35.000 cellules pour une variation approximative de volume de 0,060 mm^3 à 0,310 mm^3. Il semble donc que le développement de la rate, du moins en ce qui concerne le nombre de cellules, ne suit pas obligatoirement le développement général de l'animal. Peut-être est-elle sensible à quelque influence d'agents extérieurs.

III.- RESUME ET CONCLUSION.

Malgré l'absence de ganglions lymphatiques comparables à ceux des Vertébrés supérieurs et de quelques Anoures adultes, le complexe lympho-myéloïde du têtard d'Alytes obstetricans est organisé sur le même plan que celui de ces animaux : présence d'un thymus, existence de tous les types de cellules leucocytaires.

La disposition des organes ou tissus producteurs de cellules lymphoïdes et myéloïdes présente des caractères primitifs : existence d'un organe œsophagien comme chez les Sélaciens, association entre tissu hématopoïétique et tissu excréteur, présence à la surface du foie d'une couche de cellules hématopoïétiques d'origine péritonéale.

Remarquons aussi l'absence de spécialisation des tissus qui presque tous produisent des cellules lymphoïdes et des cellules myéloïdes. Seul le thymus paraît ne pas contenir de cellules myéloïdes.

C - LES PROTEINES SERIQUES

I.- RESULTATS QUANTITATIFS.

Les animaux que nous avons utilisés pour nos recherches immunologiques ont un sérum contenant 6,5 à 10 mg de protéines au millilitre.

II.- RESULTATS QUALITATIFS - PROTEINES SERIQUES.

L'analyse électrophorétique dans les meilleures conditions révèle l'existence de 7 constituants protéiques qu'il a fallu dénommer. Nous avons employé la terminologie classique déjà utilisée (BUTLER et col., EVANS et col., CHALUMEAU LE FOULGOC et col., CHARLEMAGNE, 1967 , GASSER, 1964-1965).

Nous distinguerons chez le têtard parvenu au stade IV_{12} (Pl. 4, fig. 1 a) :

1 fraction sérum albumine	24%
1 fraction α globuline	9%
4 fractions β globulines	54%
1 fraction γ globuline	13%

Les pourcentages donnés à titre indicatif varient considérablement avec l'âge et les individus comme l'ont remarqué HERNER et FRIEDEN.

Le résultat important de cette analyse est l'existence chez la larve d'Alyte de protéines ayant la même mobilité électrophorétique que les immunoglobines de Vertébrés supérieurs et constituées par les γ globulines et une partie des β globulines.

L'analyse immuno-électrophorétique nous a permis de préciser ces résultats. Selon les stades de développement, nous avons pu dénombrer 10 à 14 constituants protéiques dans le sérum.

Les 6 immunsérums que nous avons préparés ne donnent d'ailleurs pas tous les mêmes résultats.

Le premier ($I S_1$) ne révèle pas ou très peu la sérum albumine (Pl. 4, fig. 2 a), mais est excellent pour l'analyse des α globulines

L'$I S_2$ révèle bien la sérum albumine, mais mal les γ globulines (Pl. 4, fig. 2 b). Les quatre immunsérums suivants sont intéressants pour toutes les catégories de protéines (Pl. 4, fig. 2 c).

Nous distinguerons finalement chez un têtard parvenu au stade IV 12 (Pl. 4, fig. 1 b) :

- la sérum albumine
- 4 α globulines
- 2 lipoprotéines qui sont sujettes à des variations individuelles considérables et qui sont très labiles, en particulier sous l'action de la chaleur. Ces deux protéines n'ont pas la même mobilité électrophorétique.
- 6 β globulines
- la γ globuline nettement séparée.

Des expériences complémentaires de précipitation par le sulfate d'ammonium nous ont montré que la γ globuline de têtard ne précipite pas avec le sulfate d'ammonium à 35 % de saturation comme chez les Mammifères, mais à 70%. Il est impossible de la dissocier de l'albumine sérique par cette méthode.

Lorsque nous avons voulu obtenir la γ globuline purifiée, nous avons préféré éluer la fraction correspondante obtenue par une électrophorèse ordinaire sur papier. Un contrôle par analyse immuno-électrophorétique renseigne sur la pureté de l'échantillon obtenu (Pl. 5, fig. 2).

Remarque.

Les immunsérums 4 à 6 n'étaient pas parfaitement spécifiques d'Alytes obstetricans. En effet, en effectuant avec ces immunsérums une analyse du sérum normal de Rana esculenta, nous avons observé un arc de précipitation peu dense au niveau d'une β globuline.

III.- PROTEINES DU LIQUIDE PERITONEAL.

A l'état normal, le liquide péritonéal des jeunes têtards semble ne pas contenir de protéines. Mais si on augmente le volume du départ lors des analyses immuno-électrophorétiques, on parvient à déceler une petite quantité de sérum albumine, de β globulines et de γ globulines. Au cours du développement, on voit le taux de ces protéines augmenter, principalement celui de la sérum albumine (Pl. 5, fig. 1) et on peut déceler facilement après la métamorphose :

- la sérum albumine,
- 1 ou 2 α globulines,
- 3 β globulines,
- 1 γ globuline.

IV.- REMARQUE SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR L'ANALYSE IMMUNO - ELECTROPHORETIQUE.

La différence dans le nombre des arcs observés chez des larves d'âge différent peut avoir deux causes :

- Ou bien, au cours du développement, la larve acquiert des protéines nouvelles qui se traduisent par l'apparition d'arcs nouveaux,

- Ou bien, ces protéines sont déjà présentes dans les milieux étudiés mais en quantité trop faible pour être détectées par la méthode relativement peu sensible qu'est l'analyse immuno-électrophorétique. Les résultats obtenus en augmentant le volume de dépôt semblent confirmer cette hypothèse, tout au moins dans le cas du liquide péritonéal.

D - ROLE DU THYMUS DANS L'ONTOGENESE DU COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE

Nous avons complété notre précédente étude descriptive par une étude physiologique pour savoir si les corrélations entre les différents organes du complexe lympho-myéloïde sont identiques à celles que l'on a mises en évidence chez les Mammifères, en particulier en ce qui concerne le rôle du thymus.

Depuis les travaux de MILLER (1962, 1963), CSABA et MILLER (1963, 1964), JANKOVIC et col. (1963), on sait que le thymus est nécessaire au cours de la vie larvaire ou fœtale des Vertébrés supérieurs pour que se déroule une ontogenèse normale du complexe lymphoïde.

Nous avons donc étudié les conséquences de la thymectomie chez la larve d'Alytes.

I.- TECHNIQUES DE THYMECTOMIE.

Deux séries de 15 animaux et une série de 30 animaux parvenus au stade IV_{7-8} de CAMBAR et MARTIN ont subi l'ablation du thymus selon les techniques suivantes (Pl. 6, fig. 1).

Un volet de peau est découpé derrière l'oeil à l'aide de ciseaux à ophtalmologie. Le thymus est ainsi mis à nu, accolé à l'orbite cartilagineuse et longé antérieurement et postérieurement par deux arcs aortiques. L'arc aortique antérieur est plus profond que le postérieur et doit être repéré avec soin pour éviter de le léser au cours de l'opération.

Pour les premiers lots nous avons combiné la cautérisation du thymus (microcautère mis au point par HAGET, 1953) avec l'ablation chirurgicale. Cette technique efficace est délicate et entraîne une lourde mortalité post-opératoire (6 décès sur 15 animaux pendant la première semaine suivant l'opération).

Pour le 3e lot, nous avons simplement cautérisé l'organe. Les têtards supportent mieux cette intervention (4 décès sur 30 pendant la première semaine suivant l'opération).

Nous avons préféré ces méthodes à l'ablation chirurgicale seule. En effet, avec cette dernière, il peut subsister sur place quelques fragments

de thymus, qui sont capables de régénérer l'organe. La cautérisation élimine en grande partie ce risque.

Les animaux font tous l'objet d'un contrôle histologique car la biopsie nous a paru tout à fait insuffisante pour déceler les vestiges de thymus qui avaient échappé à la cautérisation. Les témoins sont d'une part les animaux normaux, d'autre part, des têtards ayant subi un simulacre de thymectomie.

II.- OBSERVATIONS VITALES DES ANIMAUX THYMECTOMISES.

Nous avons essayé de conserver le plus longtemps possible les animaux du 1er lot. Nous avons ainsi remarqué que les conséquences de la thymectomie n'affectaient pas de la même manière tous les animaux.

Sur les 9 survivants du 1er lot, 2 ont vécu 3 mois et se trouvaient apparemment en bon état. Ils ont été fixés avant la métamorphose, au stade IV_{10} de CAMBAR et MARTIN. 4 autres têtards sont morts entre 30 et 75 jours après l'opération : ils étaient alors cachectiques. 3 autres,enfin, ont été fixés probablement très peu de temps avant la mort alors que leur état cachectique était prononcé. Dans cette série,le contrôle histologique a montré que toutes les thymectomies étaient réussies.

Ces observations, bien que faites sur un nombre restreint de cas, ont montré d'une part que la mort ne suivait pas obligatoirement la thymectomie et d'autre part,lorsqu'elle survenait,ce n'était pas à une étape fixe. Aucun trouble n'a pu être décelé avant le 21e jour chez aucun des animaux étudiés.

Nous rapporterons donc nos résultats en fonction de la gravité de l'état cachectique, sans tenir compte de la date à laquelle il apparaît. Nous envisagerons les aspects cellulaires et humoraux des troubles dûs à la thymectomie.

III.- ASPECTS CELLULAIRES ET HUMORAUX DES TROUBLES DUS A LA THYMECTOMIE.

A - LES PREMIERES CONSEQUENCES.

On peut observer dès le premier mois, mais avant toute maladie, une diminution du nombre des leucocytes circulants (tableau 1).

	Nombre de leucocytes au µl		Nombre d'hématies au µl
	avant thymectomie	24 jours après	avant et après
1	9.000	3.000	environ 300.000
2	6.000	1.800	
3	6.000	2.700	

TABLEAU 1

La catégorie de leucocytes touchés par la thymectomie est essentiellement celle des lymphocytes. On peut observer dès le premier mois une augmentation du nombre des cellules pigmentaires du foie à rôle de macrophages (Pl. 6, fig. 2).

Dans certains cas, l'analyse du sérum révèle durant les 15 premiers jours, une baisse du taux de protéines par rapport aux témoins normaux. Mais nous avons remarqué une hypoprotéinémie semblable chez quelques têtards ayant subi un simulacre de thymectomie. Il paraît s'agir d'une dilution du sang consécutive à l'hémorragie qui se produit souvent au cours de la thymectomie.

En aucun cas, on ne distingue de modifications importantes des cellules et des centres du complexe lympho-myéloïde.

B - APPARITIONS DE FOYERS INFLAMMATOIRES.

Ces observations ont été faites sur des animaux apparemment normaux thymectomisés depuis 90 jours.

Des foyers inflammatoires à des degrés variés d'évolution sont observables dans le foie (Pl. 6, fig. 3). Les uns semblent très évolutifs. Ils consistent en une masse de cellules leucocytaires comprenant des cellules lymphoïdes et de nombreux granulocytes. Des figures de mitoses sont visibles. La disposition des cellules est anarchique.

D'autres foyers sont en voie de cicatrisation et présentent un aspect fibreux caractéristique avec une disposition concentrique des cellules(Pl. 6, fig. 4). Dans toutes ces régions le parenchyme hépatique est lésé et on observe un grand nombre de noyaux parenchymateux pycnotiques.

Les reins présentent des modifications analogues quoique plus difficiles à identifier, en raison de l'abondance de cellules lympho-myéloïdes dans cet organe, chez l'animal normal. La réaction est certaine lorsqu'on peut détecter des infiltrations de cellules dans le tissu rénal proprement dit et des lésions de ce tissu : amincissement de la paroi des tubules, lésions glomérulaires dans le mésonephros, nécroses (Pl. 7, fig. 2).

Ces modifications ont surtout été observées dans le mésonéphros. Dans le pronéphros, nous croyons avoir décelé de pareilles lésions, mais il est délicat de distinguer ce qui est dû à la thymectomie de ce qui est seulement l'involution naturelle de l'organe.

Chez ces animaux apparemment normaux, l'analyse des protéines sériques montre des modifications importantes : sur les analyses immuno-électrophorétiques, l'arc de précipitation de la sérum albumine est plus fin et plus court que chez les témoins, ce qui nous fait croire à une dimunution de son taux (Pl. 7, fig. 3).

L'analyse électrophorétique et le dosage colorimétrique relatif des fractions sur les bandes d'électrophorèse confirme cette impression. Les globulines à mobilité électrophorétique lente sont, à ce stade, peu affectées par la thymectomie.

C - CACHEXIE ET MORT.

Exemples s'échelonnant de 70 à 100 jours après la thymectomie.

1) Etat cachectique. Après l'apparition des foyers inflammatoires l'état des animaux s'aggrave, ils maigrissent beaucoup (tableau 2).

Evolution du poids des animaux thymectomisés

	Avant thymectomie		Après thymectomie
Poids moyen des animaux	Lot 1	1 g	0,6 g
	Lot 2	1,2 g	0,5 g
	Lot 3	0,8 g	0,4 g

TABLEAU 2

L'examen histologique des animaux révèle dans le foie une extension considérable des foyers inflammatoires (Pl. 6, fig. 5). Les organes lymphoïdes œsophagiens et intestinaux sont souvent dépouillés de leurs cellules (Pl. 7, fig. 1).

L'analyse des protéines sériques révèle une modification constante du protéinogramme par rapport aux animaux non cachectiques. Une estimation approximative sur les protéinogrammes montre que la quantité de protéines est environ deux fois moindre chez les témoins. Cependant les γ globulines et une partie des β globulines donnent toujours des arcs visibles sur les analyses immuno-électrophorétiques (Pl. 7, fig. 3).

Ces observations sont valables pour le début de la maladie. L'évolution jusqu'à la mort est alors rapide : 10 jours au maximum.

2) Au moment de la mort. Quelques jours après le début de cette maladie, les têtards nagent de moins en moins, s'immobilisent plusieurs heures à la surface des aquariums, le ventre en l'air et manifestent peu de réactions aux stimuli extérieurs. C'est cette période d'agonie que nous avons choisiepour les fixer.

Une dissection montre que le foie est translucide et très réduit; la rate a disparu; l'animal est anémié : son sang est incolore. L'examen histologique révèle une destruction presque complète du complexe lympho-myéloïde. Alors qu'au début de la maladie le foie conservait sa couche hématopoïétique périphérique, cette zone a maintenant entièrement disparu. Le foie n'est plus qu'un énorme foyer inflammatoire. Les reins sont dépourvus de leur tissu hématopoïétique, les organes lymphoïdes du tube digestif sont entièrement vidés de leur contenu cellulaire et il ne reste que leur stroma réticulé. Il subsiste des granulocytes et des macrophages dans des organes à prédominance myéloïde comme ceux situés à l'extrémité des poumons par exemple.

IV.- INTERPRETATION ET DISCUSSION.

En résumé, chez les têtards thymectomisés il peut se développer de violentes réactions inflammatoires, principalement au niveau du foie et des reins. Ces réactions, où interviennent toutes les cellules du complexe lympho-myéloïde, finissent par provoquer la mort de l'animal.

Des conséquences analogues s'observent aussi chez les Mammifères. Elles confirment les analogies entre le fonctionnement du complexe lympho-myéloïde d'un Vertébré inférieur et celui d'un Mammifère.

Après une chute initiale du nombre des lymphocytes circulants, que l'on peut attribuer à la disparition de l'important organe lymphocyto-poïétique qu'est le thymus, nous avons observé des signes évidents d'activité des éléments lymphoïdes et myéloïdes de l'animal privé de thymus. Des proliférations de ces cellules sont bien visibles dans les foyers inflammatoires.

D'autre part, les γ globulines et les β globulines sont parmi les protéines les moins touchées par l'opération et leur taux est important même chez les animaux malades chez lesquels on observe une forte hypoprotéinémie. Bien plus, chez certains animaux non cachectiques, mais montrant déjà des foyers d'inflammation, la quantité de γ globulines sériques paraît même augmenter en valeur absolue par rapport aux témoins normaux.

Ces résultats rappellent des observations de MILLER (1965), DE VRIES, KELLUM (1965) faites chez la souris. Ces auteurs ont en effet ob-

servé des lésions analogues à celles que nous signalons chez le têtard thymoprive. Cependant l'interprétation qu'en donne MILLER diffère sensiblement de celle de DE VRIES.

Selon MILLER, cette réaction serait due à une infection virale qui,en l'absence du thymus, provoquerait les phénomènes inflammatoires décrits. Le thymus serait donc indispensable à la maturation et au bon fonctionnement des mécanismes de défense immunitaire de l'animal.

Selon DE VRIES, ces réactions pourraient être dues à un mécanisme auto-immunitaire qui se manifesterait en l'absence de thymus. Cet organe permettrait aux cellules immunologiquement actives de reconnaître ce qui est propre à l'individu de ce qui ne l'est pas (BURNET, 1962). Privé de thymus l'animal serait ainsi attaqué par ses propres cellules immunitaires.

L'hypothèse de DE VRIES paraît d'abord tentante. En effet, les lésions que nous avons observées dans le foie et les reins ressemblent à celles que l'on observe dans le cas de maladies auto-immunitaires chez les Mammifères (néphrite en particulier). Or, des lésions semblables chez des animaux vivant dans des biotopes complètement différents s'expliquent mieux a priori par un mécanisme général comme une réaction auto-immunitaire que par une infection virale. L'augmentation des γ globulines que l'on observe chez la larve d'Alyte et qui a été aussi notée chez la souris (BAZIN et DUPLAN, 1967) pourrait être interprétée comme une synthèse accrue d'anticorps, et dans l'hypothèse de DE VRIES, d'auto-anticorps. Les lésions touchant le foie affectent naturellement la synthèse des albumines dont le siège principal est dans cet organe.

Pourtant, plusieurs faits nous amènent à préférer l'hypothèse de MILLER.

1°) Nous avons signalé que les lésions n'apparaissaient pas à date fixe. Elles se produisent du 1er au 3e mois suivant la thymectomie. S'il s'agissait d'un mécanisme fondamental comme une réaction auto-immunitaire, les phénomènes devraient se produire, semble-t-il, autour d'une date commune, puisque les animaux ont été thymectomisés au même âge. Les variations dans la date d'apparition de la maladie cachectisante s'expliquent mieux par les hasards d'une infection.

2°) Chez la souris, MILLER a signalé qu'il n 'observait jamais de telles lésions si les animaux thymectomisés étaient élevés en l'absence de tout germe. Personnellement, nous avons conservé les têtards dans des conditions proches des conditions naturelles, c'est-à-dire de façon non stérile . La contamination des animaux par des micro-organismes était donc très possible.

3°) Un autre fait à l'appui de cette hypothèse est la localisation de ces lésions au niveau du foie et des reins. Nous avons pu observer,et nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant, que la répartition d'une substance injectée chez le têtard variait selon le mode d'injection. En particulier, une injection par voie vasculaire est suivie d'une concentration de la substance injectée dans le foie et les reins. Dans les conditions de vie normale d'un têtard

la voie de pénétration d'un micro-organisme est constituée surtout par les branchies, donc ensuite par la voie sanguine. On constate ainsi une analogie entre les lieux où l'on observe effectivement les lésions et ceux où se concentrent normalement les micro-organismes ou autres substances étrangères introduites dans l'organisme.

Si l'hypothèse d'une infestation par micro-organismesest correcte, il s'ensuit vraisemblablement une réaction inflammatoire dont les aspects ne sont pas spécifiques du micro-organisme. En effet, il est peu probable que l'agent infestant soit le même chez le têtard et la souris, alors que l'aspect des lésions est voisin.

Il s'agit donc d'une violente réaction inflammatoire, qui ne se produirait pas en présence du thymus. Elle mobilise une quantité énorme de cellules qui semblent gaspillées et qui se comportent de manière anarchique, ce qui expliquerait aussi les observations faites sur les fractions globuliniques.

On peut même imaginer que cette réaction inflammatoire initiale modifierait certains tissus du têtard au point de les rendre auto-antigéniques. Il y aurait alors effectivement une réaction d'auto-immunité mais secondaire.

E - CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Une étude descriptive sommaire du complexe lympho-myéloïde et des protéines sériques d'un têtard d'Anoure, Alytes obstetricans, nous a permis de préciser la place de cet animal dans l'échelle phylogénique. Son complexe lympho-myéloïde est perfectionné par rapport à celui des Agnathes qui ne possèdent pas de thymus différencié. Il présente cependant des caractères primitifs par rapport à celui des Vertébrés supérieurs et même par rapport à celui de certains Amphibiens.

1) A l'inverse de ce qu'on observe chez les Vertébrés supérieurs, nous avons noté l'existence d'un gros organe lymphoïde œsophagien comme chez les Sélaciens, l'absence de ganglions lymphatiques et de moelle osseuse. La signification exacte de l'organe lymphoïde œsophagien nous échappe. On a souvent tendance à homologuer la rate à l'organe lymphoïde œsophagien des Sélaciens (organe de Leydig) auquel on peut comparer celui du têtard. Il représenterait alors chez le têtard un vestige des formes ancestrales. Sa position dorsale et son association au tube digestif peut nous inciter aussi à le rapprocher de la bourse de Fabricius des Oiseaux dont, jusqu'à présent, on n'a pas trouvé l'homologue chez les Amphibiens.

2) Si l'on compare la larve d'Alytes aux autres Amphibiens, on voit qu'elle possède un système hématopoïétique rappelant celui des Urodèles adultes. En outre, nous n'avons pas trouvé de "lymph glands" comme cela a été observé chez la larve de Rana catesbiana au voisinage du pronephros. En revanche nous avons remarqué une association étroite entre le tissu lymphoïde et le tissu excréteur soit dans le pronephros, soit dans le mésonephros.

Ces différences d'ordre anatomique sont amenuisées par la similitude de certaines corrélations entre les éléments du complexe lymphoïde. Comme chez les Mammifères, le thymus est indispensable au bon fonctionnement de ce complexe et les conséquences de la thymectomie se ressemblent beaucoup dans ces deux groupes de Vertébrés.

Ces résultats nous ont orienté vers l'étude du comportement des têtards soumis à divers stimuli antigéniques.

CHAPITRE III

DEFENSES NATURELLES

REPARTITION DES ANTIGENES

CHAPITRE III

DEFENSES NATURELLES

REPARTITION DES ANTIGENES

Avant d'étudier les réactions immunologiques des têtards d'Alytes obstetricans, nous devons savoir de quelle façon est traité le matériel étranger introduit dans l'organisme.

Nous envisagerons successivement le cas de l'introduction de cellules étrangères libres, de substances solubles et d'un greffon.

A - MATERIEL ET METHODES

I.- TECHNIQUES DE GREFFE ET D'IMMUNISATION.

A - LES GREFFES.

Anesthésie . Nous employons toujours le méthane sulfonate de tricaïne (MS 222 Sandoz) à la concentration finale de 0,5 p. 1.000 pendant 3 à 4 minutes.

Greffes de peau . Nous avons utilisé la technique mise au point par DUPUY (1964) sur le même matériel qui consiste à découper un carré de peau de 2 mm de côté sur deux têtards et à interchanger les fragments ainsi libérés. L'opération se fait à sec en plaçant les opérés sur du papier filtre humide. Cette émersion prolongée (4 minutes) ne semble pas affecter les animaux.

Greffes de muscle. Nous avons choisi de greffer un fragment de muscle droit abdominal, car la trame pigmentée sur laquelle il est fixé le rend bien visible une fois greffé.

Nous avons pratiqué des autogreffes et des homogreffes de ce tissu musculaire :

- Autogreffes : on place l'animal sous la loupe binoculaire sur un lit de papier filtre humide. Puis, après avoir ouvert la peau du ventre, on découpe aux ciseaux un carré de muscle droit abdominal d'environ 2 mm de côté. Ce greffon est déposé immédiatement dans une goutte de Ringer pour Amphibiens (concentration saline 6,5 p. 1.000). On referme la paroi abdominale avec 3 points de suture sans recoudre les plans musculaires.

On prépare ensuite un logement sous la peau de la queue et on maintient son ouverture béante avec les mors d'une paire de pinces fines (Pl. 8, fig. 2). On peut alors introduire le greffon avec d'autres pinces et on retire les deux instruments. Il n 'est pas nécessaire de suturer, la fermeture de la plaie intervenant rapidement (en 7 heures à 20° C). L'opération dure 4 à 7 minutes.

- Homogreffes : dans ce cas, on sacrifie un animal pour lui prélever tout le muscle droit abdominal. Celui-ci est immergé dans le Ringer et découpé sur une lame de verre en fragments de forme carrée ou rectangulaire d'environ 4 mm^2. Puis on effectue les transplantations sur un lot de receveurs selon la méthode déjà décrite pour les autogreffes.

B - TECHNIQUES D'IMMUNISATION.

Elles diffèrent peu selon le matériel injecté. Les injections sont de deux types :

- Par voie intracardiaque. Le coeur d'un têtard anesthésié est dégagé de son péricarde et maintenu à l'aide d'une paire de pinces . On introduit une quantité de liquide comprise entre 1 et 2 µl au moyen d'une pipette Pasteur doublement effilée et graduée, munie d'un embout de caoutchouc. Le coeur est ensuite remis en place et l'animal placé en eau pure. La fermeture de la plaie est rapide et n'exige pas de point de suture.

- Par voie intrapéritonéale. Les animaux ne sont pas anesthésiés et leur paroi abdominale est séchée avec du papier filtre à l'endroit de l'injection. On perce avec une effilure de pipette les plans cutanés et musculaires et on injecte la quantité de substance désirée. Par cette voie les animaux supportent des injections de 10 à 20 µl.

II.- REPARTITION DES SUBSTANCES INJECTEES.

A - TECHNIQUES D'OBSERVATION APRES LES GREFFES.

Les greffes de tissu musculaire abdominal se prêtent très bien à l'observation vitale au microscope, en raison du contraste entre le greffon riche en chromatocytes et la peau transparente de la queue. Nous avons réalisé une petite chambre à contention en polystyrène expansé pour les observations vitales prolongées. Nous avons ainsi pu filmer les phénomènes se déroulant à

l'intérieur du greffon en utilisant une caméra Beaulieu Reflex R 16 électrique, montée sur le tube photo d'un microscope Nachet 300 à contraste interférentiel et contraste de phase. Nous avons employé le film couleurs Ektakrome commercial et Kodakrome II.

B - SUBSTANCES SOLUBLES.

Nous avons utilisé des protéines de lapin et de têtard comme antigène. Pour étudier la répartition de ce type d'antigène, nous avons injecté à nos animaux de la γ globuline de mouton marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine. Les animaux sont sacrifiés 1 h, 3 h, 24 h et toutes les 24 h jusqu'à 10 jours après l' injection pour être l'objet des préparations suivantes : confection de frottis de sang et de liquide péritonéal, empreintes de foie, de reins, de rate, de thymus, coupes à la congélation dans le foie. Chacune de ces préparations est observée au microscope à fluorescence de Leitz (voir chapitre premier II A 2 b). La fluorescence verte de l'isothiocyanate et son intensité renseigne sur la position du matériel injecté, soit dans les organes, soit dans les cellules.

C - CELLULES.

Nous avons employé des hématies de mouton ou des hématies humaines (Institut Pasteur). Nous les avons utilisées surtout pour suivre les phénomènes de phagocytose dans le liquide péritonéal. Nous prélevons le liquide 1/ 2 h, 1 h, 2 h, 3 h, 24 h après l'injection. L'examen se fait entre lame et lamelle, au microscope ordinaire ou à contraste de phase.

B - RESULTATS

Lorsqu'on introduit une substance ou des cellules dans un organisme, il peut se produire plusieurs phénomènes : ou bien les agents étrangers sont soumis immédiatement à des facteurs solubles de défense naturels et sont détruits, ou bien ils sont pris en charge par les phagocytes. Chez le têtard les deux agents coexistent.

I.- EXISTENCE D'UN AGENT CYTOLYTIQUE NATUREL CHEZ LE TETARD D'ALYTES.

A - MISE EN EVIDENCE.

Lorsqu'on introduit chez le têtard normal des cellules étrangères, par voie sanguine ou intrapéritonéale, on s'aperçoit qu'elles sont rapidement lysées. Nous avons observé ce phénomène avec les hématies humaines, les hématies de mouton, de lapin, de grenouille, de triton, ainsi qu'avec les leucocytes de ces différentes espèces.

Cette activité ne se manifeste pas à l'égard des cellules provenant d'autres individus de la même espèce. En outre tous les animaux ne la présentent pas avec la même intensité.

Ce phénomène peut s'étudier in vitro lorsqu'on met ces différentes cellules en suspension dans du sérum ou du liquide péritonéal provenant d'animaux normaux, n'ayant subi aucune préparation. La lyse n'est pas accompagnée d'une agglutination des hématies (Pl. 9, fig. 1). Nous avons pu mesurer cette activité cytolytique en fonction du type de cellule utilisé. Le tableau n° 3 résume l'activité cytolytique du sérum d'un lot de têtards d'hiver parvenus au stade IV_{10} de CAMBAR et MARTIN.

Dilution du sérum	Leucocytes grenouille $5 \times 10^2/\mu l$	Hématies mouton $1 \times 10^6/\mu l$	Hématies humaines $1 \times 10^5/\mu l$	Hématies grenouille $3 \times 10^4/\mu l$
1/2	+	+	+	+
1/6	-	+	+	+
1/9	-	+	-	-
1/20	-	-	-	-

TABLEAU n° 3

B - CARACTERISTIQUES DE CETTE ACTIVITE CYTOLYTIQUE.

1) Elle n'est pas due à des phénomènes osmotiques résultant des différences de concentration saline entre les sérums des animaux cités et le sérum de têtard : en effet, d'une part cette lyse se produit avec des cellules d'autres Amphibiens, d'autre part le traitement par la chaleur, qui ne modifie pas la salinité du sérum, supprime l'activité hémolytique. Vingt minutes à 56° C suffisent pour inactiver complètement le sérum. Celle-ci n'est pas restaurée par l'addition de sérum frais de cobaye.

2) L'emploi de l'acide éthylène diamine tétracétique (E.D.T.A.) à la concentration finale de 0, 03 M permet d'inhiber l'action cytolytique du sérum. Le pouvoir chélateur de l'E.D.T.A. à l'égard des ions Ca^{++} et Mg^{++} suggère un rôle possible de ces ions ou de l'un d'entre eux dans la réaction de lyse. Cependant, l'addition d'ions Ca^{++} et Mg^{++} (sous forme de $Mg\,SO_4$ et $Ca\,Cl_2$) au liquide inactivé ne restaure que très mal l'activité lytique comme le montre le tableau n° 4.

	Sérum normal	Sérum + 0, 03 M E.D.T.A.	Sérum + E.D.T.A. + 0, 012 M Ca et Mg sous forme de $Ca\,Cl_2$ et $Mg\,Cl_2$
% hématies lysées	75%	0 - 1 %	8 - 12 %

Activité cytolytique du sérum de têtard en présence d'E.D.T.A. et d'ions calcium et magnésium (10 µl de sérum + 50 x 10^6 hématies humaines).

TABLEAU n° 4

C - ESSAIS D'IDENTIFICATION.

Nous les avons pratiqués chez la larve, mais surtout chez l'adulte car ce dernier fournit de plus grandes quantités d'un sérum plus actif que le sérum larvaire. On peut en effet, chez certains adultes, obtenir une lyse des hématies de mouton jusqu'à une dilution de I/40. Cette grande activité est avantageuse étant donnée la labilité du facteur hémolytique. En outre, nous avons étendu cette étude aux adultes et aux larves de Rana esculenta et de Rana dalmatina.

Nous avons appliqué à ces sérums la technique mise au point pour détecter une substance cytolytique chez le ver du fumier, Eisenia fœtida (DU PASQUIER, DUPRAT, 1968).

Le sérum prélevé sur des animaux neufs, non préparés, est soumis à l'action d'un champ électrique, comme pour une analyse immuno-électrophorétique normale en agarose. Après la séparation, on dépose dans la rigole centrale l'immun sérum anti protéines sériques d'Alytes ou de Rana selon le cas. On laisse diffuser les réactifs l'un contre l'autre pendant 12 h jusqu'à ce qu'apparaissent les ébauches des arcs de précipitation. A ce moment on coule à la surface de la lame d'agarose une couche d'agarose salée (9 p. 1.000)à laquelle on incorpore des hématies de mouton (10 µl de la suspension à 50% de l'Institut Pasteur pour 1 ml d'agarose) ou des hématies humaines.

La diffusion des protéines est alors possible non seulement dans le plan horizontal, mais aussi dans le plan vertical. Dans ce cas toute la quantité d'agent cytolytique qui n'a pas encore précipité avec l'immunsérum diffuse dans l'agarose au sang. Il y provoque la lyse des globules rouges. Cette lyse se traduit macroscopiquement par la formation d'une zone d'hémolyse limitée plus ou moins selon les cas, par l'arc de précipitation de l'agent hémolytique (Pl. 9, fig. 2 et 3). Quel que soit le type d'hématie employé,la lyse se produit toujours au même endroit, ce qui prouve que toutes les lyses sont dues à un même agent.

Ce dernier supporte mal les conditions d'électrophorèse et son activité décroît avec l'augmentation de la durée de migration, sans doute à cause de sa sensibilité à la chaleur dégagée par l'effet Joule au cours de la migration. Pour cette raison, la durée de migration a été limitée à 1 h 30 ou 2 h.

Il apparaît ainsi que l'agent hémolytique naturel a la même mobilité électrophorétique que la plus abondante des lipoprotéines sériques, celle qui possède la plus faible mobilité électrophorétique. La zone d'hémolyse est quelquefois bien limitée par l'arc de précipitation de cette protéine, mais le plus souvent elle le déborde car selon les concentrations de l'immunsérum et de l'agent cytolytique, la réaction antigène-anticorps inhibe ou n'inhibe pas l'activité de ce facteur.

Il paraît raisonnable de penser que le facteur hémolytique est une lipoprotéine, ou un facteur enzymatique lié à une lipoprotéine.

L'action de lipoprotéines dans des mécanismes de défense naturelle est bien connue chez les Vertébrés supérieurs. CAVALLO et IMPERATO (1967),dans leur revue des facteurs naturels de défense chez les Vertébrés,rappellent l'action de certaines lipoprotéines dans les phénomènes de bactériolyse et de neutralisation des virus.

Le fait que l'agent cytolytique puisse être séparé par électrophorèse des autres constituants du sérum sans perdre son activité, montre bien qu'il s'agit d'un facteur unique. De plus, un essai de sensibilisation des globules rouges par la γ globuline purifiée du sérum normal a été négatif. Le phénomène de lyse ne peut donc pas être attribué à la lyse par le complément d'hématies sensibilisées par des anticorps naturels. Ces anticorps naturels auraient pu apparaître à la suite d'une immunisation par des bactéries du milieu ambiant ayant des antigènes communs avec ceux des érythrocytes.

L'agent hémolytique humoral des Amphibiens que nous avons étudiés diffère aussi de l'hémolysine trouvée chez la lamproie qui est présente dans toutes les fractions du sérum (GEWURZ et col., 1966).

Cependant notre méthode d'identification ne nous permet pas de dire si le facteur cytolytique est inné ou acquis. Nous savons simplement qu'il ne s'agit pas d'anticorps spécifiques.

Pour résoudre ce problème nous avons essayé de détecter l'apparition du facteur hémolytique naturel au cours de l'ontogenèse.

D - APPARITION DU FACTEUR HEMOLYTIQUE NATUREL AU COURS DE L'ONTOGENESE.

Les variations du pouvoir hémolytique du sérum et du liquide péritonéal des têtards nous ont fait penser que ce facteur hémolytique pouvait être une substance de défense non spécifique mais néanmoins acquise à la suite d'un contact fortuit avec un corps étranger ayant des structures communes avec les cellules susceptibles d'être lysées. De tels facteurs existent en effet dans le règne animal, en particulier chez les Sipunculiens (BANG, 1967).

Pour aborder ce problème nous avons essayé d'élever des têtards dans des conditions stériles afin de les préserver de tout contact avec des micro-organismes dont plusieurs représentants possèdent des antigènes communs avec les hématies de divers Vertébrés.

Nous avons pu isoler non pas des pontes d'Alytes obstetricans mais de Rana dalmatina dont les têtards présentent aussi cette activité hémolytique.

Les animaux sont recueillis de façon stérile à l'éclosion, élevés en eau stérile (passée sur filtre Millipore type G S, diamètre des pores 0,22 µ) et nourris avec de la salade et des flocons d'avoine stérilisés à l'autoclave. Leur aquarium est placé dans une enceinte stérile.

Avec ce régime, la croissance est très perturbée, sans doute à cause de l'absence d'une flore microbienne dans l'intestin des animaux. Nous sommes parvenus pourtant à en garder 4 en vie pendant 1 mois sur un lot initial de 25 animaux. Le pool de liquides péritonéaux obtenu à partir de ces animaux était hémolytique pour les hématies de mouton à la dilution de 1/2.

Ce résultat bien qu'obtenu sur un très petit nombre d'animaux semble bien prouver que le facteur hémolytique apparaît naturellement au cours du développement de l'animal.

E - EN RESUME, les têtards de plusieurs espèces d'Anoures possèdent dans leur sérum et leur liquide péritonéal un agent hémolytique naturel, non spécifique (le terme spécifique étant employé dans le sens défini dans l'introduction) de nature vraisemblablement lipoprotéinique.

Après l'action de ce facteur, il reste cependant des stromas cellulaires dans la circulation. En outre, de nombreux corps étrangers ou substances solubles échappent à l'action de cette hémolysine naturelle et subissent un sort différent.

II.- REPARTITION DES SUBSTANCES INJECTEES.

A - RESULTATS A 22° C.

1) Injections de cellules.

Injectées par voie intrapéritonéale ou intracardiaque, les hématies peuvent dans certains cas être lysées par un agent naturel non spécifique. Les stromas sont ensuite phagocytés après un stade d'agglutination à la surface de la membrane cellulaire des macrophages, bien visible au microscope à contraste de phase (Pl. 10, fig. 3). Chez les jeunes têtards qui ne possèdent pas encore d'hémolysine naturelle, la phagocytose est plus facilement observable car les hématies sont entières.

Selon le mode d'injection, la phagocytose se produit dans des endroits différents. Après une injection par voie sanguine, elle a lieu principalement dans le foie. Après une injection intrapéritonéale, ce sont les phagocytes du liquide péritonéal qui sont actifs. Ce liquide contient à l'état normal beaucoup de cellules leucocytaires (600 à 2.000 par µl).

2) Greffon.

Bien visible sous la peau de la queue, le greffon de muscle droit abdominal se prête à l'observation vitale au cours de la "prise de contact" entre l'hôte et le greffon.

Une hémorragie locale se produit au moment de l'opération, et a pour effet de déclencher le processus d'invasion par des leucocytes. Presque aussitôt, on peut observer dans la région de la greffe un ralentissement du courant sanguin. Les leucocytes, qu'on ne pouvait distinguer dans les vaisseaux à cause de leur vitesse, se collent maintenant aux parois des vaisseaux (1ère heure). On les voit, très réfringents, se déplacer lentement le long des vaisseaux (Pl. 11, fig. 1). Arrivés sur les lieux de la greffe, ils passent dans les tissus environnant les capillaires, soit par diapédèse, soit poussés par le flux sanguin (Pl. 11, fig. 2 et 3). Ils s'accumulent ainsi près du greffon et on peut observer des phagocytoses d'éléments lésés du greffon, en particulier des grains de pigment (Pl. 11, fig. 4; Pl. 12, fig. 1). La cicatrisation de l'incision cutanée suit son cours, la fente est fermée 7 h après la pose du greffon.

Dans les jours qui suivent, la dépigmentation du greffon s'accentue et les phagocytoses se font plus nombreuses. Les macrophages sont ainsi marqués par le pigment phagocyté et on peut suivre leur destinée (Pl. 11, fig. 5). Après la phagocytose, phénomène actif, les macrophages deviennent très passifs : ils reprennent la forme sphérique qu'ils avaient dans les vaisseaux sanguins et sont soumis aux courants lymphatiques qui circulent très lentement autour du greffon, dans des lacunes du tissu conjonctif. On les voit alors, accompagnés d'ailleurs de grains de pigment libres, et de chromatocytes entiers détachés du greffon, emprunter ces lacunes et s'éloigner lentement du site de la greffe. Nous avons pu observer et filmer un tel processus durant les 2e, 3e et 4e jours après la greffe. Loin du site de la transplantation, ces éléments du greffon, phagocytés ou non, gagnent la circulation sanguine. Les lacunes et les sinus lymphatiques entourant le greffon sont en relation avec des vaisseaux sanguins. A partir de ce moment, les matériaux du greffon se trouvent dans les mêmes conditions que des cellules injectées par voie sanguine. Ils sont arrêtés essentiellement dans le foie où le nombre de cellules pigmentées augmente considérablement (Pl. 12, fig. 2). Certains macrophages du foie sont naturellement pigmentés, mais il est vraisemblable que l'augmentation énorme du nombre des cellules pigmentées est due à l'arrivée de pigment en provenance du greffon.

3) Substances solubles après une injection intrapéritonéale.

Les γ globulines de mouton marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine se répartissent de manière différente selon la quantité injectée.

a) Injection de 10 µl de solution à 10 g de protéines /l.

Les premières cellules qui captent la protéine étrangère sont les macrophages péritonéaux ou les monocytes. La protéine est concentrée dans des vacuoles cytoplasmiques (Pl. 12, fig. 3, 4, 5). Le sang véhicule ensuite ces cellules chargées de γ globulines fluorescentes comme le montrent des frottis de sang effectués 3 h après l'injection.

A ce stade, deux organes concentrent la protéine injectée : le pro et le mésonéphros (Pl. 12, fig. 6). Il est vraisemblable que ces organes éliminent une grande partie du matériel injecté. Durant cette élimination, les cellules du complexe lympho-myéloïde, abondantes dans les reins, peuvent entrer en contact avec la substance injectée.

b) Injection de 20 µl d'une solution à 15 g de protéines /l.

La répartition d'une telle dose présente avec le cas précédent, non seulement une différence quantitative dans l'intensification de la fluorescence, mais aussi une différence qualitative : on retrouve d'une part l'antigène dans les appareils excréteurs, les cellules péritonéales et le sang, mais on constate d'autre part que le foie contient lui aussi la γ globuline de mouton dans les cellules histiocytaires où elle est fortement concentrée.

4) Substances solubles après injections intracardiaques.

L'expérience a montré que par voie intracardiaque, les têtards ne supportaient l'injection que d'1 à 2 µl de liquide. Les animaux ont donc reçu des injections de 1 µl de solution à 30 g/l. La répartition est différente de celle observée précédemment. Le foie est, après injection intracardiaque, l'organe qui accumule le plus rapidement et le plus abondamment l'antigène (Pl. 12, fig. 7). Le mésonéphros présente une accumulation de γ globulines identique à celle qui suit une injection intrapéritonéale, mais le pronéphros est moins atteint.

Quel que soit le type d'injection, nous avons constaté que la rate ne concentrait pas l'antigène. Seules des traces y ont été détectées par cette technique. Le thymus n'est pas atteint du tout par la substance injectée.

B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE - RESULTATS A 4° C.

L'étude historique des réactions de défense des Amphibiens nous a appris que les réponses immunitaires étaient inhibées à basse température chez les Vertébrés poïkilothermes. Nous avons cherché à savoir si cette inhibition s'exerçait sur les phénomènes de capture des antigènes.

Dans ce but, des têtards placés au préalable à 4° C reçoivent une injection d'hématies de mouton par voie intrapéritonéale ou un greffon.

1) Cas des hématies.

Le prélèvement de liquide péritonéal est effectué 3 - 24 - 48 - 72 h après l'injection. On constate la persistance des hématies injectées pendant 3 jours, alors qu'à 22° C toutes les cellules injectées avaient disparu durant les premières 24 h.

A 4° C pourtant, on observe une lyse normale d'un grand nombre d'hématies lorsque l'agent hémolytique est assez abondant dans le liquide péritonéal, mais les stromas ne sont pas phagocytés. Le nombre de phagocytoses est très réduit.

La basse température empêche l'afflux des cellules péritonéales qui suit normalement toute injection : le nombre des cellules qui est de 600 - 2.000/µl chez les témoins de cette expérience reste identique après une injection lorsque les animaux sont placés à 4° C. Au contraire, il atteint parfois 10.000/µl dans les deux jours qui suivent l'injection chez les animaux gardés à 22° C.

2) Cas d'un greffon.

Le résultat est le même. Il se traduit par l'absence de l'afflux leucocytaire. En outre, le greffon ne se désagrège pas du tout et ne libère pas de chromatocytes. On n'observe guère de passage d'éléments du greffon dans la circulation. L'état inflammatoire reste à sa phase initiale : stases sanguines dans les vaisseaux situés autour du greffon.

III.- CONCLUSIONS ET RESUME.

Il se dégage de ce chapitre deux faits importants.

1°) Le têtard d'Alytes est capable, même très jeune, de trouver une différence entre ses propres cellules ou protéines, et celles provenant d'autres Vertébrés, qu'il élimine.

2°) Des éléments étrangers,après avoir subi dans certains cas l'action de substances naturelles de défense, entrent en contact avec le complexe lympho-myéloïde de l'animal.

A - RECONNAISSANCE DES TISSUS AUTOLOGUES.

Ce mécanisme est naturellement fondamental dans une étude d'immunologie. Il existe chez tous les êtres vivants y compris les protozoaires. Sans ce mécanisme, on ne distinguerait ni individus, ni espèces chez les êtres vivants.

Le têtard préserve son individualité à l'égard des agents étrangers d'abord grâce à des mécanismes de défense naturels et non spécifiques. La présence d'un agent cytolytique naturel n'est pas un fait nouveau chez les Vertébrés. On en trouve aussi chez les Poissons, les Agnathes (GEWURZ et col., 1966) et même chez les Invertébrés, en particulier chez les Oligochètes (DU PASQUIER et DUPRAT, 1968) et les Insectes (sujet revu par CARTON 1969 - HINK 1970). Peu d'études ont été faites sur la nature de ces facteurs humoraux. Pourtant, il nous paraît intéressant du point de vue phylogénique de constater que chez les lombrics comme chez le têtard, l'agent cytolytique naturel est vraisemblablement une lipoprotéine. Il est également remarquable que l'activité cytolytique non spécifique soit beaucoup plus forte dans le liquide cœlomique des Oligochètes que dans le sérum où le liquide péritonéal du têtard.

Chez les animaux supérieurs, une telle activité cytolytique est rare et lorsqu'elle existe elle est souvent due à l'action du complément sur des cellules sensibilisées par des anticorps naturels dans le sérum et non pas à une substance aspécifique.

B - CONTACTS AVEC LE COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE.

Il intervient aussi des cellules qui phagocytent les éléments étrangers introduits dans l'organisme. Le rôle de ces macrophages semble être non seulement d'isoler les substances étrangères, mais de les véhiculer et de leur faire prendre contact avec les centres du complexe lympho - myéloïde de l'animal, comme chez les animaux supérieurs capables de réactions spécifiques d'immunité activement acquise.

Le mode de répartition des substances injectées est assez primitif chez le têtard d'Alytes obstetricans. On n'observe pas chez lui la concentration des antigènes dans des organes spécialisés qu'a constatée COOPER dans les "lymph glands" du têtard de Rana catesbiana. De toutes façons, le mode de répartition d'un antigène est plus primitif même chez les adultes d'Amphibiens que chez les Mammifères ou les Oiseaux à cause de la structure plus simple de leur complexe lympho-myéloïde (DIENER et NOSSAL, 1966).

Des facteurs naturels, cellulaires ou humoraux, ne constituent en général qu'une partie de l'équipement de défense des animaux contre l'introduction d'éléments étrangers. Nous allons donc rechercher dans le chapitre suivant si le têtard est capable, comme les animaux plus évolués, de montrer des réactions immunitaires spécifiques et activement acquises.

CHAPITRE IV

ASPECTS CELLULAIRES ET HUMORAUX DE L'IMMUNITE SPECIFIQUEMENT ET ACTIVEMENT ACQUISE CHEZ LA LARVE D'*ALYTES*

CHAPITRE IV

ASPECTS CELLULAIRES ET HUMORAUX DE L'IMMUNITE SPECIFIQUEMENT ET ACTIVEMENT ACQUISE CHEZ LA LARVE D'ALYTES.

Parmi les preuves de l'existence de réactions spécifiques d'immunité acquise chez les animaux, l'une des plus claires est la mise en évidence d'une synthèse d'anticorps par les cellules du complexe lymphoïde. Une autre preuve, dont l'intérêt est grand en immunologie comparée, est la mise en évidence d'une intolérance acquise à l'égard des greffes. Ce sont les deux types de réponse qui seront analysés ici.

A - TECHNIQUES.

Les techniques de greffe et de leur examen vital et histologique, ainsi que les techniques d'immunisation, ont été exposées aux chapitres II et III. Il reste à exposer les techniques de détection des anticorps. Ces méthodes ont deux buts :

1) Mettre en évidence l'existence de cellules productrices d'anticorps,
2) Permettre de détecter et d'identifier dans le sérum les anticorps ainsi élaborés.

I.- MISE EN EVIDENCE DE CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

A - SUR DU MATERIEL VIVANT.

Nous avons essayé deux méthodes qui sont couramment employées en immunologie cellulaire chez les Mammifères : la méthode d'hémolyse locale et celle d'immuno-cyto-adhérence.

1) Hémolyse locale (ou méthode des plages de lyse).

Cette technique permet la détection des cellules productrices d'anticorps hémolytiques. Nous avons appliqué aux cellules spléniques d'Amphibien, les méthodes de JERNE et NORDIN (1963), d'INGRAHAM et BUSSARD (1964) et de CUNNINGHAM (1965).

a) Principe de la méthode : les cellules lymphoïdes provenant d'animaux immunisés avec des hématies de mouton sont placées dans un milieu de culture. On ajoute à cette suspension cellulaire des globules rouges identiques à ceux qui ont servi à l'immunisation, ainsi que du complément de cobaye. La suspension est incubée pendant 2 h entre lame et lamelle à 30° C. Pendant ce temps, les cellules actives synthétisent des anticorps antiglobules rouges de mouton qui diffusent dans le milieu. Le complément provoque la lyse des hématies sensibilisées et il se forme une plage d'hémolyse circulaire, ayant la cellule active en son centre. Chez les Mammifères, cette méthode est connue pour mettre principalement en évidence les cellules productrices d'anticorps fortement hémolytiques, c'est-à-dire des γ globulines de poids moléculaire élevé, autrement dit les Immuno-globulines Macro-globulines (IgM).

b) Réalisation :

- Prélèvement de la rate - préparation des cellules spléniques.

Les animaux anesthésiés selon la technique habituelle sont placés sous la loupe binoculaire (grossissement : 10 fois). La cavité abdominale est ouverte. On peut alors voir la rate, située sur le côté gauche de l'œsophage, sous le foie, dans la région dianéphrétique. Elle a la forme d'une petite olive de quelques centaines de μ de longueur. On l'excise à l'aide de ciseaux à ophtalmologie et on la transporte dans une salière contenant 0,1 ml de milieu de culture et maintenue dans la glace fondante.

Le milieu est celui de Eagle, obtenu à l'Institut Pasteur. Afin d'être rendu isotonique aux cellules d'Amphibiens, il est dilué 1, 3 fois avec de l'eau distillée.

On dilacère alors la rate sous la loupe entre les mors de deux paires de pinces fines soigneusement affutées. On met ainsi en suspension le plus grand nombre possible de cellules. Cette suspension est transvasée dans un tube de 0,5 ml de contenance et on y estime le nombre de cellules vivantes par un comptage à la cellule de Thoma ou de Malassez.

Ce travail est facilité par l'emploi du microscope à contraste interférentiel de Nachet. Les cellules mortes apparaissent plates et transparentes alors que les cellules vivantes donnent une impression de relief. Une comparaison entre le nombre de cellules lymphoïdes obtenues par dilacération et celui compté sur une série de coupes histologiques dans une rate de même taille montre que l'on perd environ 20% des cellules.

- Application de la technique proprement dite.

Il existe plusieurs protocoles opératoires selon que l'on utilise un milieu gélifié ou un milieu liquide. La méthode de CUNNINGHAM en phase liquide nous a paru la plus sensible et la plus simple. C'est la seule dont l'application à notre matériel sera décrite.

Nous avons employé les suspensions à 50% d'hématies de mouton fournies par l'Institut Pasteur (culot globulaire provenant de la centrifugation

du sang mélangé à un volume égal de solution d'Alsever). Les hématies sont lavées trois fois avant usage, par centrifugation.

La suspension de 0,1 ml de cellules spléniques contenant 2,5 µl de globules à 50% et 25 µl de complément de cobaye (complément lyophylisé de l'Institut Pasteur) est placée entre lame et lamelle dans des chambres spéciales. Chaque chambre est confectionnée de la façon suivante : sur chaque grand côté d'une lame de microscope, on dépose avec un pinceau une fine couche de paraffine fondante. Après refroidissement on obtient ainsi deux longues cales sur lesquelles on pose deux lamelles carrées de 24 x 24 mm que l'on soude avec de la paraffine à l'endroit où elles reposent sur les cales.

Avec une pipette on introduit le mélange entre la lame et la lamelle jusqu'à remplir la chambre parfaitement. On ferme alors les deux côtés restés libres et on laisse incuber les préparations à 30° C sur une surface parfaitement horizontale pendant 2 heures.

L'observation et le comptage des plages de lyse se fait au microscope à fond noir et à contraste de phase.

2) Immuno-cyto-adhérence (I.C.A.) - Méthode des rosettes.

Nous avons appliqué la technique de BIOZZI et col. (1966).

a) Principe : Les cellules lymphoïdes isolées provenant d'un animal immunisé avec des globules rouges hétérologues sont mélangées, dans une solution isotonique tamponnée, avec l'espèce de globules rouges utilisée comme antigène. La préparation est maintenue à 2° C. A cette température, la synthèse des anticorps est arrêtée mais les cellules lymphoïdes productrices ont suffisamment d'anticorps à leur surface pour provoquer l'adhérence des globules rouges. Il se forme alors une "rosette" constituée par la cellule lymphoïde productrice d'anticorps entourée de globules rouges. On peut facilement compter les rosettes.

b) Réalisation : Le milieu isotonique que nous avons employé est le même que pour la méthode des plages de lyse; c'est le milieu de Eagle dilué 1,3 fois. La suspension de cellules spléniques est préparée comme pour un test d'hémolyse locale et placée dans un tube de 0,4 ml. Après comptage des cellules en suspension, on réalise une concentration de cellules spléniques comprise entre 50.000 et 150.000/0,1 ml et on ajoute les globules rouges : 7×10^6 hématies de mouton ou $3,5 \times 10^6$ hématies humaines. Les tubes sont ensuite placés à + 2° C pendant 5 h au moins et 12 h au plus. Les cellules se sédimentent. On les remet en suspension en tournant très doucement le tube entre le pouce et l'index. On peut alors compter les "rosettes" entre lame et lamelle. Nous avons toujours observé le volume entier de la préparation, ce qui élimine une cause d'imprécision.

B - SUR DU MATERIEL FIXE.

Nous avons pu adapter à notre matériel le principe des méthodes d'immunofluorescence de Coons.

1) Principe.

C'est une méthode immunohistologique permettant la localisation d'antigènes (ou d'anticorps) dans les tissus au moyen de leur réaction in situ avec leur anticorps (ou leur antigène) correspondant rendu préalablement fluorescent.

Cette méthode directe prévoit que l'on dispose pour chaque anticorps (ou antigène) recherché de l'antigène (ou anticorps) correspondant, marqué par un fluorochrome. La préparation de ces réactifs marqués est délicate et nous avons préféré employer une méthode indirecte, également plus sensible, qui permet d'utiliser des produits commercialisés. Nous avons appliqué cette méthode à deux types de détection.

a) Détection de globulines intracellulaires: Un lapin reçoit une série d'injections de globulines de têtard et synthétise des anticorps contre elles. On fait réagir les anticorps de lapin avec des cellules lymphoïdes de têtard que l'on soupçonne de synthétiser des globulines et plus particulièrement des immunoglobulines. La réaction antigène-anticorps a lieu lorsque ces globulines existent. On se trouve alors en présence de cellules ayant fixé in situ les anticorps du sérum de lapin.

On fait ensuite réagir un deuxième immunsérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine que l'on peut obtenir dans le commerce et qui contient des anticorps anti anticorps de lapin(Sérum anti γ globulines de lapin de l'Institut Pasteur). De cette manière seront finalement fluorescentes les cellules ayant synthétisé des globulines.

b) Détection d'anticorps anti γ globulines de lapin : Des têtards reçoivent des injections de γ globulines de lapin et synthétisent des anticorps contre elles. Des cellules lymphoïdes, que l'on pense capables de synthétiser des anticorps, sont mises en contact avec les γ globulines de lapin qui ont servi d'antigène. Les cellules, contenant des anticorps contre elles, fixent les γ globulines de lapin in situ. Après lavage, il ne reste plus qu'à révéler les cellules productrices d'anticorps avec l'immunsérum fluorescent anti γ globulines de lapin.

2) Réalisation.

a) Matériel :

- Immunsérum de mouton anti γ globulines de lapin marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Ce sérum nous a été aimablement fourni par Monsieur le Professeur J. PILLOT de l'Institut Pasteur que nous remercions vivement.

- Solution saline tamponnée :

Na Cl	6,5 g
Na_2 H PO_4	1,07 g
Na_2 H_2 PO_4 2 H_2 O	0,39 g
Eau distillée	1.300 ml

- Na Cl en solution 0,15 M et M.

- Microscope à fluorescence - Voir chapitre II.

b) Mode opératoire :

Cas de la détection d'anticorps anti γ globulines de lapin.

- Préparation des réactifs.

Afin d'éviter des réactions parasites entre les cellules et les réactifs, il convient d'épuiser ceux-ci sur tous les agents qui diffèrent de ceux que l'on recherche dans l'expérience. On réalise l'épuisement du sérum de lapin ayant servi d'antigène et celui du sérum fluorescent sur des cellules lymphoïdes provenant d'animaux non immunisés et sur des broyats d'animaux entiers ou des lyophilisats d'animaux entiers. On broie par exemple à froid deux ou trois foies de têtard dans 1 ml de sérum physiologique et on verse ensuite 1 goutte de sérum fluorescent, avec le doseur du flacon. On laisse reposer plusieurs heures à froid avant de centrifuger. Le surnageant est constitué de 1 ml de sérum fluorescent dilué au 1/100. On opère de même manière avec le sérum ayant servi d'antigène. Les réactifs sont alors prêts pour la recherche des anticorps dans le foie. On opère de la même manière selon les organes étudiés avec les reins, la rate, etc... .

- Confection des coupes et des frottis.

Les observations ont été faites sur des empreintes de rate, de foie, de reins, d'organes lymphoïdes pulmonaires, ainsi que sur des coupes de foie faites au microtome à congélation (Leitz-Kryomat).

Les coupes sont faites à -20° C. La coupe, une fois sur la lame, est fixée pendant 2 mn dans l'alcool éthylique à 95° à -20° C. Empreintes et frottis sont fixés de la même façon. Après la fixation, on lave les lames dans la solution saline tamponnée. Les lames sont alors prêtes pour le test d'immunofluorescence.

- Test d'immunofluorescence.

1er temps : on fait agir sur les lames le sérum de lapin normal contenant des γ globulines et dilué au 1/100, à raison de 1 ml pour chaque lame. On laisse réagir pendant 20 mn en chambre humide à la température du laboratoire.

Le lavage qui suit doit être très soigné car il conditionne en partie l'absence de fluorescence parasite. On lave 2 fois 5 mn avec le Na Cl M tamponné et 2 fois 20 mn avec la solution physiologique tamponnée.

2ème temps : on expose les préparations au sérum fluorescent anti γ globulines de lapin dilué au 1/100 pendant 20 mn en chambre humide et

on lave comme précédemment. On monte ensuite dans la glycérine tamponnée à pH 7,2 entre lame et lamelle.

Témoins.

- Des coupes sont montées après la fixation pour observer la fluorescence naturelle des cellules.

- On fait un témoin en omettant l'exposition des cellules au sérum de lapin. En principe, le sérum fluorescent ne doit pas se fixer sur les cellules du têtard.

Lorsqu'on recherche les globulines intracellulaires, le procédé est identique, seul change le sens des réactions antigène-anticorps. Dans ce cas, le produit à détecter est celui qui a servi à immuniser le lapin, autrement dit, c'est un antigène présent dans les cellules du têtard.

1ère étape : on expose les cellules du têtard au sérum de lapin antiglobuline de têtard. Les anticorps du sérum immun se fixent sur les cellules productrices de globulines.

2ème étape : le sérum fluorescent anti γ globulines de lapin révèle uniquement les cellules productrices de globulines de têtard .

Témoins : nous avons fait les mêmes que ceux décrits dans le paragraphe précédent. En outre, pour vérifier la spécificité de la fixation de l'immunsérum de lapin sur les globulines de têtard, nous l'avons remplacé par du sérum de lapin normal. Les résultats ont été négatifs.

II. - DETECTION D'ANTICORPS CIRCULANTS.

Nous avons essayé de mettre en évidence, surtout qualitativement en raison des faibles quantités de sérum dont nous disposions , des anticorps circulants sériques ou péritonéaux, chez les têtards immunisés.

Nous avons employé comme antigène la sérum albumine bovine, les protéines de lapin, les protéines de têtard de la même espèce, les globules rouges humains et ovins.

Après plusieurs injections de ces antigènes, le sérum prélevé était soumis aux tests de précipitation en gélose ou d'hémagglutination directe et passive.

A - PRECIPITATION EN GELOSE - DOUBLE DIFFUSION.

Nous avons adapté à notre matériel le principe des méthodes d'OUDIN et d'OUCHTERLONY.

1) Principe.

Les anticorps et les antigènes en solution diffusent l'un vers l'autre dans un milieu gélifié et si leurs concentrations sont adéquates, la réaction antigène-anticorps se traduit par l'apparition d'une zone de précipitation.

2) Réalisation en tube.- Double diffusion en tube.

Des cannes de verre de 8 mm de diamètre sont étirées à la flamme pour en faire des tubes de 1,5 mm de diamètre et 40 mm de long. Ces tubes sont enduits intérieurement d'une couche de gélose à 3% que l'on fait sécher à 80° C. Cette couche a pour rôle de bien faire adhérer au tube la gélose où diffuseront les réactifs.

Avec une effilure de pipette Pasteur préchauffée, on coule sur une hauteur de 1 cm une gélose à 1,5 % tamponnée par la solution suivante à pH 8,2 :

Acide borique ..... 15 g
Lessive de soude ..... 4 ml
Eau distillée ..... 1.000 ml

Ce tampon est antiseptique et permet de ne pas employer le merthiolate de soude pour éviter les moisissures.

Après quoi, avec une micropipette, on coule 20 µl de solution d'antigène d'un côté de la couche de gélose et 20 µl de solution d'anticorps de l'autre côté. Les extrémités du tube sont bouchées à la pâte à modeler. On le dispose dans un réfrigérateur à 4° C, sur un ratelier en carton ondulé. Les zones de précipitation, lorsqu'elles apparaissent, sont visibles le deuxième jour.

Nous n'avons pas appliqué la technique de diffusion simple qui fait appel à des sérums gélifiés par de l'agar. En raison des petits volumes dont nous disposions l'opération de gélification des sérums était rendue très délicate.

3) Réalisation sur plaque.- Double diffusion sur plaque.

Des lames de microscope sont enduitesd'une couche de gélose à 3% et séchées sur une platine chauffante. Une couche de gélose tamponnée au tampon borate à pH 8,2 est coulée, à raison de 3,5 ml par lame. Des trous de 2,5 mm de diamètre sont percés avec un emporte-pièce. Ils sont disposés à 2,5 mm d'un puits central.

Le puits central reçoit l'immunsérum à tester et les puits périphériques l'antigène à des concentrations variées. Les plaques sont maintenues à + 2° C en chambre humide. Les précipités apparaissent comme dans le cas d'une analyse immuno-électrophorétique dans les 16 h qui suivent.

B - HEMAGGLUTINATION.

1) Hémagglutination directe.

- Principe : la réaction antigène-anticorps entre les antigènes érythrocytaires et les anticorps anti-globules rouges se traduit par l'agglutination de globules rouges. Des dilutions successives de l'immunsérum permettent de faire une estimation quantitative de la synthèse des anticorps anti-érythrocytes.

- Réalisation : sur une lame de microscope ou sur une plaque de Kline, une goutte de sérum (50 µl) provenant des animaux immunisés est mise en contact avec 10 µl d'une suspension à 2% de globules rouges ayant servi à l'immunisation (Culot globulaire dilué après centrifugation jusqu'à représenter 2% du volume de la suspension).

Dans ces conditions, nous savons qu'une hémolysine naturelle peut être active dans le sérum et dans ce cas les hématies ne sont plus visibles. Il vient aussi s'ajouter la lyse des hématies sensibilisées provoquée par le complément présent dans le sérum. Il faut donc observer les préparations en contraste de phase pour détecter une éventuelle agglutination des stromas. Des dilutions successives donnent des renseignements quantitatifs.

2) Hémagglutination passive.

- Principe : les hématies de mouton, lorsqu'on les traite avec une solution diluée d'acide tannique, acquièrent la propriété d'adsorber les protéines. De tels érythrocytes, enrobés de protéines antigènes, sont agglutinés par l'immunsérum correspondant. Ce principe peut d'ailleurs être appliqué à des particules inertes comme les particules de latex qui peuvent aussi adsorber les protéines à leur surface et permettre des tests d'agglutination passive. Nos expériences ont été peu nombreuses et peu probantes avec cette technique, nous ne donnerons donc pas le détail du mode opératoire décrit par CAMPBELL et col. (Methods in Immunology) pour l'hémagglutination passive et par DUFAU-CASANABE pour les tests au latex.

C - ESTIMATION DU POUVOIR D'HEMOLYSE.

Pour suivre l'évolution du pouvoir hémolytique du sérum ou du liquide péritonéal après immunisation avec des globules rouges, nous avons procédé de la manière suivante :

1) Par dilutions successives.

Dans un microtube, 0,05 ml de la dilution étudiée sont mis en présence de 2 µl de suspension de globules rouges à 50% soigneusement lavés. La lyse est estimée à l'oeil, positive ou négative par rapport aux témoins.

2) A concentration constante.

Dans un microtube 0,05 ml de sérum anti globules rouges dilué au 1/2 sont mis en présence de 2 µl de suspension à 50%. Le degré de lyse est

examiné après centrifugation pour chaque sérum ou liquide péritonéal par passage au photomètre à 540 mμ.

Cette méthode n'est qu'approximative, car il est probable que, comme chez les Mammifères, la relation qui lie le nombre d'hématies lysées à la quantité d'anticorps dans le sérum n'est pas représentée graphiquement par une droite (MAYER, in KABAT et MAYER : Experimental Immunochemistry) Les résultats obtenus par cette méthode nous ont simplement servi à détecter la date du maximum d'une réaction.

De toute façon, nous avons opéré dans une zone d'hémolyse où 20 à 80% des hématies étaient lysées. Or dans cette zone, la relation quantité d'anticorps - nombre d'hématies lysées est pratiquement représentée graphiquement par une droite chez les Mammifères.

Nous n'avons pas ajouté de complément aux sérums.

B - RESULTATS.

Il est très difficile, lors d'une étude des réactions immunitaires d'un animal, de séparer les aspects cellulaires des aspects humoraux de la réponse. Pourtant, nous garderons cette séparation à cause des techniques employées.

Dans une première partie, nous ferons l'analyse des réactions spécifiques d'immunité acquise à l'égard d'antigènes provenant de Vertébrés phylogéniquement éloignés (mouton, lapin, boeuf, homme).

Dans la deuxième partie, nous étudierons les réactions éventuelles à l'égard d'antigènes provenant d'animaux de la même espèce (iso-antigènes).

Première partie

ANALYSE DES REACTIONS DU TETARD D'ALYTES A L'EGARD D'ANTIGENES PROVENANT D'ANIMAUX PHYLOGENIQUEMENT ELOIGNES.

I.- CINETIQUE DE LA REACTION ETABLIE PAR L'ETUDE DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS ANTI HEMATIES.

Le comportement des cellules lymphoïdes de larves d'Alytes immunisées avec divers globules rouges de Mammifères a été comparé à celui des cellules d'un animal normal.

A - CHEZ L'ANIMAL NORMAL.

Les résultats concernent les cellules spléniques de têtards parvenus aux stades IV_{10} à 13 de CAMBAR et MARTIN.

Il a été possible de détecter, dans la rate de tous les animaux normaux étudiés, un certain nombre de cellules formant naturellement des rosettes (C.F.R. naturelles) avec les globules rouges que nous avons utilisés :

hématies humaines du groupe B, hématies de mouton. Le taux de ces C.F.R. naturelles varie d'ailleurs selon le type d'hématies et selon les individus. C'est ainsi qu'avec les globules rouges humains il varie de 60 à 150 C.F.R. pour 10^5 cellules spléniques.

Avec les globules de mouton il ne varie que de 8 à 20 C.F.R./10^5 cellules spléniques. La méthode des plages de lyse ne nous a pas permis de déceler dans la rate des cellules formant naturellement des plages. Dans un cas, nous avons pu en détecter une dans le tissu intertubulaire du mésonéphros. Chez les adultes, au contraire, il n'est pas rare d'en trouver 1 ou 2 par rate.

B - CHEZ L'ANIMAL IMMUNISE.

L'étude de la rate d'animaux immunisés révèle deux faits principaux :

1°) Une augmentation de la taille de la rate,
2°) L'apparition dans la rate de cellules productrices d'anticorps.

1) Augmentation de la taille de la rate.

Elle a été évaluée en mesurant la hauteur, la largeur et la longueur de la rate d'animaux immunisés, et en comparant ces dimensions à celles des rates normales. Pour rendre plus facile la lecture des résultats (Pl. 13) nous avons fait le produit des trois nombres obtenus qui donne une valeur approximative du volume de l'organe.

On constate une augmentation de volume au cours des 5 premiers jours, suivie d'une décroissance jusqu'au 20e jour. Le volume de la rate peut être environ doublé ou triplé au maximum de la réaction.

2) Apparition dans la rate de cellules productrices d'anticorps.

a) Détection par la méthode des plages de lyse. - Nous prendrons comme type de réponse, celle de têtards immunisés par voie intracardiaque avec 7×10^6 hématies de mouton.

On constate dans ce lot l'apparition de cellules formant des plages de lyse (C.F.P.) dès le premier jour suivant l'immunisation. Leur nombre augmente jusqu'aux 5e et 6e jours, où il atteint 10 C.F.P./10^5 cellules spléniques. Leur nombre décroît ensuite très vite (Pl. 14).

Des contrôles, effectués en l'absence de complément, montrent qu'aucune plage n'apparaît dans ces conditions, ce qui prouve qu'on assiste bien à une hémolyse d'hématies sensibilisées et non à une libération d'hémolysine naturelle non spécifique dont l'action ne dépend pas de la présence du complément.

Un avantage de la méthode des plages de lyse est qu'elle ne présente aucune ambiguité d'interprétation : on est sûr que toute cellule formant une plage est bien productrice d'anticorps.

b) Détection par la méthode immuno-cyto-adhérence (I.C.A.) ou méthode des rosettes : avec cette méthode on ne décèle pas l'apparition de cellules formant des rosettes puisqu'il en existe déjà à l'état naturel. On remarque simplement une augmentation de leur nombre après l'injection. Le délai d'augmentation du nombre de C.F.R. est le même qu'avec la méthode d'hémolyse locale. Quantitativement, cette technique est plus sensible, le nombre de cellules formant des rosettes atteint dans certains cas 70 à 80 C.F.R./10^5 cellules spléniques, soit 7 à 8 fois la valeur du "bruit de fond" (Pl. 15).

Cette méthode n'est malheureusement pas aussi sûre que la technique des plages de lyse. On n'est pas certain que toutes les C.F.R. sont productrices d'anticorps. En effet, des rosettes peuvent se former sur des cellules ayant fixé passivement des anticorps.

L'ambiguité existe aussi chez les Mammifères (BUSSARD, 1964; STORB et col., 1969) et nous avons estimé nécessaires les contrôles suivants:

- Essai de fixation passive sur des cellules spléniques normales :

Malgré la basse température à laquelle nous opérons, on peut craindre que les cellules actives libèrent des anticorps qui viendraient se fixer sur des cellules lymphoïdes elles-mêmes non productrices.

Nous avons essayé de sensibiliser passivement in vitro des cellules d'animaux normaux avec du sérum de têtard immunisé. Nous avons choisi pour cela le sérum de têtard d'Alytes ayant donné une réponse de l'ordre de 50 C.F.R./10^5 cellules spléniques et 4 C.F.P./10^5 le 4e jour après l'injection.

Des cellules spléniques de têtards normaux ont été mises en suspension dans ce sérum pendant 1 h 30 à 2° C puis soumises au test de l'I.C.A. Le nombre de C.F.R. mesuré sur un pool de cellules spléniques a été 10/10^5, soit un chiffre compatible avec la valeur moyenne du taux de rosettes naturelles (8 à 20/10^5). Ce test n'est pas très rigoureux car nous avons fait les essais d'adsorption avec du sérum entier. Il aurait mieux valu incuber les cellules normales dans du surnageant de cellules actives en culture pour éviter une compétition entre les différents constituants du sérum qui empêcherait, par exemple, la fixation de γ globulines anticorps peu abondantes au profit de l'albumine ou de β globulines.

Pour des raisons techniques ce témoin n'a pas encore été réalisé. Cependant nous verrons plus loin (Chapitre V, II A), que dans des conditions proches de celles de ce témoin idéal, il n'a pas été possible de détecter une fixation passive d'anticorps à la surface de cellules normales.

-Test de dilution :

Ces résultats sont confirmés par une autre expérience. Pour prouver que la formation des rosettes est due à un processus non coopératif

entre les cellules, il faut prouver que le nombre de rosettes obtenues dans un mélange de cellules normales et de cellules provenant d'animaux immunisés est proportionnel au nombre de cellules immunes introduites dans le mélange.

Des cellules spléniques provenant d'animaux normaux dont le taux de C.F.R. naturelles est seulement $6/10^5$ ont été mélangées dans des proportions connues avec des cellules spléniques d'animaux immunisés avec des hématies de mouton et ayant donné une réponse de 60 à 77 C.F.R./10^5 le 3e jour.

Les résultats que l'on peut lire sur la planche 16,montrent que le nombre de rosettes comptées dans le mélange est directement proportionnel au nombre de cellules provenant d'animaux immunisés.

Il semble donc qu'il n'y ait aucune fixation passive in vitro d'anticorps sur des cellules spléniques normales. Par conséquent la formation des rosettes chez les animaux immunisés serait bien due à la présence d'anticorps synthétisés par la cellule elle-même.

La grande différence quantitative des résultats fournis par les deux méthodes d'immuno-cyto-adhérence et d'hémolyse locale s'observe aussi chez les Mammifères. Sa signification a été discutée par BUSSARD (1964) et BIOZZI et col. (1967). La méthode des rosettes est plus sensible car elle permet la détection de deux types d'anticorps, ceux qui sont fortement hémolytiques (IgM) et ceux qui le sont moins (les IgG). D'autre part la formation des rosettes n'exige pas la présence d'une grande quantité d'anticorps. Cependant, on ne peut négliger le risque de compter parmi les cellules formant des rosettes,des cellules ayant fixé passivement des anticorps in vivo,ou ayant agglutiné les globules autrement que par l'effet des anticorps. A notre avis, le risque est grand surtout chez les animaux non immunisés, chez lesquels la différence entre les deux méthodes est considérable, en particulier chez nos animaux : absence de C.F.P. naturelles et présence de C.F.R. naturelles

En conclusion, par deux méthodes,nous avons montré que le têtard d'Alytes obstetricans réagissait à l'introduction d'un antigène tel que des globules rouges de mouton par l'apparition et l'augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps.

Ce fait acquis, nous avons analysé expérimentalement l'influence du type d'hématie, de la dose, de la voie d'injection, d'une seconde injection, ainsi que la spécificité de la réaction. En raison de sa sensibilité, nous avons surtout employé la méthode des rosettes.

II.- ANALYSE EXPERIMENTALE DES ASPECTS CELLULAIRES DE LA REPONSE IMMUNOLOGIQUE A L'EGARD DES GLOBULES ROUGES.

A - INFLUENCE DU TYPE D'HEMATIE.

On voit sur la planche 15 que la réponse qui suit une injection d'hématies humaines est beaucoup plus forte que celle qui suit une immunisation avec des hématies de mouton. La différence que l'on avait constatée au niveau du taux de rosettes naturelles persiste. Dans chaque cas cependant, la cinétique de la réaction est comparable et le nombre maximum de cellules (C.F.R.) formatrices de rosettes (C.F.R.) après une immunisation est dans les deux cas 6 à 8 fois supérieur au nombre de C.F.R. naturelles.

L'étude de l'influence du type d'érythrocyte sur la réponse cellulaire n'a pas été pratiquée avec la méthode d'hémolyse locale en raison d'une trop grande résistance des hématies humaines à la lyse, ou de l'absence d'un bon complément.

B - INFLUENCE DE LA DOSE ET DE LA VOIE D'INJECTION.

Nous avons étudié l'influence de la dose et de la voie d'injection sur 13 lots (tableau 5).

Les résultats sont représentés sur les planches 15 et 17.

Type de test	Type hématie	Injection	Dose nb.hém./g/pdscorps	Nb. anim.	N° lot	Planche
Plage de lyse	Mouton	IP	7×10^6	15	1	14
		IC	7×10^6	20	2	"
		IC	7×10^6	20	3	"
		IC	7×10^5	17	4	
I.C.A.	Mouton	IP	7×10^6	20	5	15
		IP	7×10^6	20	6	"
		IC	7×10^6	30	7	"
		IC	20×10^6	8	8	17
		IC	7×10^5	20	9	"
	Homme	IP	2×10^6	24	10	15
		IC	2×10^6	8	11	17
		IC	5×10^5	30	12	15
		IC	2×10^5	12	13	17

TABLEAU 5

Quelle que soit la méthode de mesure employée, nous avons constaté qu'à dose équivalente, une injection intrapéritonéale entraînait une réaction plus tardive et plus faible que l'injection intracardiaque.

Les résultats montrent que la dose optima de globules rouges n'est pas la même pour les deux types de globules. En outre, on peut obtenir une réponse équivalente avec les deux voies d'injection pourvu que l'on augmente considérablement la dose injectée par voie intrapéritonéale (Pl. 15).

Avec des hématies de mouton, la dose optima par voie intracardiaque semble être de 7×10^6 hématies par gramme de poids du corps. Une injection de 7×10^5 hématies entraîne une réponse plus faible; 20×10^6 hématies ne provoquent qu'une augmentation assez faible du nombre des C.F.R. au moment du pic de la réaction(Pl. 17).

Pour les globules rouges humains, la dose optima par voie intracardiaque est de 5×10^5/g poids du corps. Une dose de 2×10^5 entraîne une réponse plus faible alors que 2×10^6 ne provoquent pratiquement aucune réaction; il y a peut-être dans ce cas un phénomène de paralysie immunologique due à la trop grande importance de la dose.

C - SPECIFICITE DE LA REPONSE.

Comme nous le verrons plus loin, dans la discussion générale, l'intérêt d'une étude des réactions immunitaires chez le têtard est subordonné à la spécificité de la réponse d'immunité acquise.

Nous rappelons ce qu'on entend par spécificité. Le terme est employé ici pour indiquer la caractéristique d'un anticorps : se combiner avec un type unique d'antigène ou avec une gamme étroite de groupements antigéniques très voisins. Une protéine qui aurait la faculté de se combiner avec des groupements antigéniques stéréochimiquement différents ne pourrait guère être considérée comme un anticorps.

Nous avons réalisé les expériences suivantes :

1°) Trois lots de têtards ont été immunisés avec des hématies de mouton et trois autres lots avec des hématies humaines. Au moment du maximum de la réponse immunologique les cellules spléniques de chaque lot ont été soumises au test d'I.C.A. d'une part avec l'espèce d'hématie ayant servi à l'immunisation et d'autre part avec une autre espèce d'hématie.

Les résultats que l'on peut lire sur le tableau 6 montrent que l'augmentation du nombre de C.F.R. est spécifique de l'espèce d'hématie ayant servi à l'immunisation.

	Nombre de rosettes avec hématies humaines (pour 10^5 cell. spl.)			Nombre de rosettes avec hématies de mouton (pour 10^5 cell. spl.)		
Lots	1	2	3	1	2	3
Immunisés Hématies mouton	110	140	180	80	40	40
Immunisés Hématies humaines	320	480	470	20	18	10
Témoins	130 ± 51			14 ± 4		

TABLEAU 6

Spécificité de la réaction immunologique d'un têtard immunisé avec des globules rouges humains. Chaque pool représente 5 animaux.

En aucun cas l'augmentation du nombre de C.F.R. obtenue avec les espèces de globules rouges non utilisées pour l'immunisation n'est statistiquement significative.

2°) Observation microscopique :

Des cellules spléniques d'animaux immunisés avec un seul type d'hématie (homme ou mouton) sont soumises au test de l'I.C.A. en présence d'un mélange d'hématies d'homme et d'hématies de mouton. Les globules rouges humains sont beaucoup plus grands que ceux du mouton et on peut facilement repérer les rosettes constituées de l'un ou l'autre type d'hématie, ou éventuellement des deux.

Or 90% des rosettes ne sont constituées que de l'espèce de globules ayant servi à l'immunisation ce qui laisse penser que la réponse est spécifique.

On peut critiquer cette expérience en faisant remarquer qu'il peut exister une certaine compétition entre les antigènes érythrocytaires au moment de la réaction antigène-anticorps et que celle-ci favoriserait les hématies du type ayant servi d'antigène.

Ces résultats nous semblent cependant complémentaires de ceux du paragraphe précédent où aucune compétition n'avait lieu puisque chaque type d'hématie était essayé séparément.

D - REPONSE A UNE SECONDE INJECTION DU MEME ANTIGENE.

Les auteurs ayant travaillé sur les Amphibiens ont assez peu étudié le problème de la réponse secondaire, sauf dans le cas des greffes. DIENER et NOSSAL (1966) chez l'adulte de Bufo marinus ont trouvé que la réponse secondaire à l'égard d'antigène de Salmonella n'était ni plus forte que la première, ni plus précoce. Cependant EVANS et col. (1966) qui utilisaient des antigènes différents, ont pu mettre en évidence une réponse secondaire anamnestique et spécifique à l'égard d'antigènes tels que les bactériophages ou la sérum albumine bovine.

1°) Nous avons abordé cette question avec les techniques d'analyse d'immunologie cellulaire.

Des lots de têtards ont été immunisés avec des hématies de mouton par voie intrapéritonéale (7×10^6 hématies/g poids du corps) ou intracardiaque (7×10^5 hématies/g poids du corps). Ils ont subi une deuxième injection de 3×10^6 hématies lorsque le taux de C.F.R. était retombé à une valeur voisine de celle des témoins, soit 12 jours après l'injection intracardiaque et 17 jours après l'injection intrapéritonéale.

Dans les deux cas, les expériences qui portaient sur 32 animaux ont montré une augmentation très rapide, mais très fugace, du taux de C.F.R. après la 2e injection (Pl. 18). Les valeurs atteintes au maximum de cette réponse secondaire sont sensiblement les mêmes que celles obtenues dans la réponse primaire.

Le caractère essentiel de cette réponse secondaire, qui est conforme au cas général, est l'accélération du mécanisme de production de cellules actives.

2°) Nous avons aussi étudié un deuxième type de réponse secondaire avec les cellules du liquide péritonéal.

Nous avons déjà signalé qu'une injection d'antigène par voie intrapéritonéale entraînait une augmentation du nombre des cellules dans le liquide péritonéal. Nous avons pu constater que cette augmentation était beaucoup plus forte après une 2e injection, et spécifique de l'antigène utilisé.

Deux groupes de têtards (20 animaux) ont été immunisés par voie intrapéritonéale l'un avec 5×10^6 hématies de mouton, l'autre avec 10 µl de sérum total de lapin dilué au 1/2. Dans les deux cas l'augmentation primaire du nombre de cellules est la même (Pl. 19).

Après 15 jours, chaque lot a été divisé en deux et a reçu une 2e injection. Les deux premiers demi lots ont reçu une injection d'hématies de mouton et les 2 seconds une injection de protéines de lapin. Une augmentation très importante (environ 10 fois le nombre témoin de cellules) est décelable lorsque la 2e injection a été pratiquée avec l'antigène correspondant à la 1ère injection. Dans l'autre cas, on observe une réponse équivalente à la réponse primaire.

En résumé, les têtards d'Alytes gardent une trace d'un premier contact avec un antigène. Ceci se traduit par un afflux cellulaire accéléré et plus important après une 2e injection d'un même antigène et par une production accélérée de cellules synthétisant des anticorps.

III.- ASPECT HUMORAL DE LA SYNTHESE D'ANTICORPS ANTI GLOBULES ROUGES.

La possibilité de détecter chez les têtards des cellules libérant des anticorps autour d'elles montrent que ces animaux peuvent synthétiser des anticorps circulants. Nous les avons recherchés pour établir un parallèle entre l'aspect cellulaire et l'aspect humoral de la réaction du têtard à l'injection de globules rouges.

En raison des très petites quantités disponibles de sérum, et des tests employés, nos résultats numériques sont assez peu précis.

A - MISE EN EVIDENCE D'ANTICORPS DANS LE SERUM ET LE LIQUIDE PERITONEAL.

6 lots de têtards ont reçu par voie intrapéritonéale ou intracardiaque des doses de 10×10^6 G.R.M./g de poids du corps. Le liquide péritonéal et le sérum prélevés sont soumis aux estimations semi-quantitatives décrites au paragraphe A II c.

Les résultats groupés sur la planche 20 montrent, après une injection péritonéale, un retard dans l'augmentation du pouvoir de lyse ainsi qu'une réponse plus faible que dans le cas d'une injection intracardiaque. Nous avions déjà mis en évidence une telle différence avec les méthodes d'analyse cellulaire.

B - SPECIFICITE DE L'AUGMENTATION DU POUVOIR HEMOLYTIQUE.

Nous devons nous assurer que cette augmentation correspond à l'apparition d'anticorps dans le sérum ou le liquide péritonéal et non à l'augmentation de la quantité d'hémolysine naturelle.

Un lot de têtards a subi une injection d'hématies de mouton et son sérum immun a été mis en présence, séparément, d'hématies d'homme et de mouton.

Les résultats sont rapportés sur le tableau n° 7.

On constate que l'augmentation du nombre d'hématies lysées n'apparaît de façon significative que lorsqu'on utilise les mêmes globules que ceux qui ont servi à l'immunisation, nous considérons donc la réponse humorale comme spécifique.

	L.P.+G.R.H.		L.P.+G.R.M.		Sérum + G.R.H.		Sérum + G.R.M.	
Lots	1	2	1	2	1	2	1	2
Témoins	41,5	43	49,5	50,5	46,5	46	43,5	45,5
Immunisés	43	44	56,5	55,7	44,7	44	59,3	62
Résultats	+1,5	+1	+7	+5,2	-1,8	-2	+16,3	+16,5

TABLEAU 7

Pourcentage d'hématies lysées par le liquide péritonéal (L.P.) ou le sérum de têtards d'Alytes obstetricans immunisés 6 jours au préalable par une injection intracardiaque de 10×10^6 G.R.M./g poids du corps. Réponse cellulaire mesurée avec la technique d'I.C.A. : 70 C.F.R. pour 10^5 cellules spléniques.

G.R.H. : globules rouges humains
G.R.M. : globules rouges de mouton.

C - ROLE DU COMPLEMENT.

Pour être plus sûr encore que nous détectons bien des anticorps, nous avons vérifié que l'augmentation du pouvoir d'hémolyse dépendait de la présence du complément. Le rôle du complément a déjà été mis en évidence dans l'hémolyse provoquée par une seule cellule (même chapitre, I B,2 a).

Le sérum de têtard est donc chauffé 25 mn à 56° C. Il ne possède plus aucun pouvoir de lyse après ce traitement.

Le sérum normal chauffé,additionné de complément de cobaye,ne retrouve pas son activité lytique naturelle.

Au contraire, l'immunsérum de têtard anti hématies de mouton chauffé et additionné de 20% de sérum de cobaye retrouve une activité lytique partielle qui correspond à la lyse des hématies sensibilisées par les anticorps anti G.R.M. En raison des faibles volumes recueillis ce contrôle n'a été que qualitatif.

En résumé, l'augmentation de la lyse spécifique ne se produit qu'en présence de complément.

IV. - SYNTHESE D'ANTICORPS CONTRE DES PROTEINES ETRANGERES.

Nous avons essayé d'obtenir chez le têtard une synthèse d'anticorps contre la sérum albumine bovine et les protéines du sérum de lapin.

A - RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-SERUM ALBUMINE BOVINE.

Nos résultats ont été négatifs. Les tests d'hémagglutination passive pratiqués sur le sérum des animaux immunisés ont été négatifs.

Les animaux ont été immunisés par voie intracardiaque avec 2 µl d'une solution d'albumine à 1 % (Albumin Bovine Fraction V Powder NBC).

Le sérum et la rate sont prélevés 5 jours après l'injection.

Le sérum a donné des résultats négatifs que ce soit avec la technique au latex ou celle d'hémagglutination passive.

Les cellules spléniques ont été soumises au test de l'I.C.A., avec les hématies recouvertes d'albumine bovine (D.H. CAMPBELL et col., Methods in Immunology). Il n'a pas été détecté d'augmentation vraiment significative du nombre des C.F.R. :

Nombre de C.F.R. naturelles: 115-120/10^5 cellules spléniques
" après immunisation : 117-135/10^5 " "

B - ANTICORPS ANTI-PROTEINES DU SERUM DE LAPIN.

5 lots de 5 animaux ont reçu des injections intrapéritonéales de sérum de lapin. Chaque animal a reçu 6 injections de 10 µl de sérum dilué au 1/10. 15 jours après la dernière injection, les animaux ont fait l'objet des expériences suivantes :

- Essai de précipitation en gélose avec le sérum.
- Expérience d'immunofluorescence sur les cellules lymphoïdes.

1) Anticorps précipitants.

Deux lots seulement ont fourni un sérum contenant des anticorps précipitants. Le premier a permis l'observation d'une zone de précipitation très fine qui a disparu le 3e jour après la mise en présence de l'antigène et de l'anticorps. La position de la zone de précipitation entre les puits dépendait de la concentration des sérums, ce qui nous laisse croire qu'il s'agissait bien d'un précipité immunologique.

Avec le sérum du deuxième lot, nous avons observé une zone de précipitation plus floue, mais qui a persisté après lavage. Il n'a pas été possible de pratiquer des analyses immuno-électrophorétiques sur ces échantillons en raison du faible volume de sérum dont nous disposions et qui a été totalement employé pour les tests d'OUCHTERLONY.

2) Immunofluorescence.

Les expériences d'immunofluorescence ont permis de détecter des cellules productrices d'anticorps chez les animaux immunisés même dans les lots où nous n'avons pu mettre en évidence d'anticorps sériques. Il est vrai que la méthode de précipitation en gélose (diffusion double) n'est pas une méthode très sensible.

Nous avons surtout observé ces cellules, sur la nature desquelles nous reviendrons au chapitre V, dans le foie et le mésonéphros. Il n'a pas été possible d'en détecter dans la rate par cette méthode.

Cette méthode permet donc d'affirmer que les têtards sont capables de synthétiser des anticorps contre des antigènes solubles provenant d'animaux phylogéniquement très éloignés.

Résumé de la première partie.

En résumé, les têtards d'Alytes sont capables de synthétiser des anticorps spécifiques contre divers types d'antigènes ayant une origine phylogénique très éloignée.

Il semble qu'il soit plus facile d'obtenir une réponse contre des antigènes figurés que contre des antigènes solubles si l'on en juge par l'échec de nos stimulations avec l'albumine bovine et les longs programmes d'immunisation nécessaires pour obtenir une réponse avec les protéines de lapin.

Il serait maintenant intéressant de savoir si le têtard est capable de synthétiser des anticorps ou de montrer une réaction d'immunité acquise quelconque lorsqu'il est stimulé par des antigènes provenant d'animaux phylogéniquement proches de lui.

Nous savons déjà que les mécanismes de défense naturelle dont il est pourvu lui permettent de détruire les cellules d'Amphibiens d'espèces différentes (grenouille, triton) mais non celles d'animaux de la même espèce : les mécanismes d'immunité acquise seront-ils plus électifs ?

Deuxième partie

REACTION D'IMMUNITE ACQUISE CONTRE LES ISO-ANTIGENES.

Nous avons étudié le cas de têtards immunisés avec des protéines sériques d'animaux de la même espèce, et le cas des têtards porteurs d'homogreffes.

I.-APTITUDE DES TETARDS D'ALYTES OBSTETRICANS A SYNTHETISER DES ANTICORPS CONTRE DES PROTEINES ISOGENIQUES (i.e. provenant de têtards de la même espèce).

A - IMMUNISATION.

Trois lots de têtards provenant du bassin du laboratoire ont été immunisés avec du sérum de têtards provenant d'une mare éloignée de 8 kilomètres. Ceci évitait de faire des immunisations entre animaux génétiquement très voisins.

Le sérum utilisé pour l'immunisation était un pool conservé au congélateur.

Les têtards immunisés ont reçu des injections de 10 µl par voie intrapéritonéale. Les injections étaient espacées d'une semaine. Un lot a subi des injections d'antigène émulsionné dans l'adjuvant complet de Freund.

B - RESULTATS.

Les tests de précipitation effectués une semaine après la dernière injection ont donné les résultats groupés dans le tableau n° 8.

Lot	Durée immunisation	Nombre injections	Nombre animaux gardés jusqu'à la dernière injection	Positif
1	2 mois	8	5	1
2	"	8	7	2
3	"	8+adj.	10	7

TABLEAU 8

Toutes les prises d'essai effectuées avant la dernière injection étaient négatives ou douteuses. Dans la plupart des cas, nous avons décelé une zone de précipitation (Pl. 21, fig. 2, 3, 4).

C - SPECIFICITE DE LA REACTION.

Dans 9 cas sur 10 la réaction de précipitation ne s'est produite qu'en mettant en contact l'immunsérum d'une part et le sérum utilisé comme antigène d'autre part.

Dans un cas, nous avons obtenu une zone de précipitation non seulement avec le sérum antigène, mais aussi avec le sérum d'un têtard n'ayant pas servi à l'immunisation.

Ce résultat peut être interprété de deux façons :

1°) Dans l'hypothèse où les anticorps sont spécifiques des iso-antigènes, notre résultat unique tend à prouver l'existence de groupes ou familles d'iso-antigènes au sein des protéines sériques.

2°) Dans l'hypothèse contraire, où les anticorps ne sont pas spécifiques, ils réagiraient avec des groupements antigéniques même très différents de ceux qui ont provoqué leur apparition. Notre résultat unique (1/10) peut être interprété dans ce sens.

Nous pensons plutôt que si les anticorps n'étaient pas spécifiques, ils auraient réagi dans tous les cas avec un sérum quelconque de têtard d'Alytes et non pas avec un seul.

En conséquence, nous concluons avec COOPER et col., qui ont fait indépendamment les mêmes types d'expériences avec des résultats voisins, que ces anticorps sont spécifiques.

En résumé : les mécanismes de "reconnaissance du soi" chez le têtard sont capables de déceler des différences existant entre les protéines d'individus différents de la même espèce (allotypes). Cette aptitude se traduit par une synthèse d'anticorps si l'organisme d'un têtard est stimulé par une injection de ces protéines étrangères.

II.- APTITUDE DES TETARDS A REJETER LES HOMOGREFFES.

Nos expériences ont confirmé les données déjà établies (voir Historique) et ont apporté quelques éléments sur le mécanisme et la cinétique des phénomènes. Ces expériences ont été exposées en détail dans notre thèse de 3ème Cycle (DU PASQUIER, 1965). Nous en donnons un résumé.

A - COMPARAISON ENTRE AUTOGREFFES ET HOMOGREFFES.

1) Cas des autogreffes de tissu musculaire maintenues à 22° C (Pl.22).

Une hémorragie locale se produit au moment de l'opération. Presque aussitôt, on peut observer dans la région de la greffe un ralentissement du courant sanguin provoqué par une accumulation des éléments figurés du sang.

Dans les jours qui suivent, le greffon se dépigmente partiellement (voir chapitre II) et se recroqueville. Un réseau vasculaire l'envahit à partir du 4e jour.

L'examen histologique montre la présence de nombreux leucocytes et nous avons été frappé par l'abondance des granulocytes éosinophiles.

Plus tard, la striation du muscle, observable jusqu'au 21e jour, disparaît peu à peu. Privé de ses connexions naturelles, en particulier de son innervation, le greffon perd son aspect de muscle fonctionnel.

Environ 30 jours après l'opération, le greffon a atteint un état stable. Il conserve sa pigmentation et paraît indifférent à l'hôte puisqu'on peut le retirer facilement du lit de la greffe. Il est cependant irrigué et très faiblement innervé.

L'analyse du sérum tout au long de la réaction ne révèle aucune modification du taux des γ et β globulines.

2) Cas des homogreffes de tissu musculaire faites à 22° C (Pl. 22).

- Durant les 3 premiers jours, la réaction inflammatoire diffère très peu de celle observée lors des autogreffes. Nous avons aussi remarqué un afflux leucocytaire important avec une éosinophilie marquée. La vascularisation s'établit dès le 3e jour pour s'achever le 7e ou le 8e jour après la pose du greffon. Aucune modification interprétable du taux des immunoglobulines n'est encore observable dans le sérum.

- Plus tard, dès le 11e jour, des différences entre auto et homogreffes apparaissent. Le nombre des leucocytes, au lieu de diminuer comme dans une autogreffe, augmente, pour former une masse volumineuse entre le greffon et la musculature caudale .

Au cours de cette seconde période l'analyse du sérum révèle une augmentation des γ et β globulines (Pl.23) dont le taux passe de 15 à 18%.

- C'est à partir du 11e jour que se déroule à proprement parler le phénomène de rejet ou de résorption du greffon. Ses contours deviennent flous, les mélanophores se désagrègent, des accidents de vascularisation se produisent. La masse de cellules leucocytaires augmente de volume jusqu'au 15e jour (Pl. 22, fig. 1, 2). Des expériences d'immunofluorescence ont montré qu'à ce stade on rencontre dans le lit de la greffe des cellules lymphoïdes contenant des globulines ayant probablement une activité d'anticorps.

Des observations du même type, mais faites sur les tissus du greffon montrent que le greffon est recouvert de globulines de l'hôte.

L'analyse du sérum révèle à ce stade une forte augmentation du taux des β et γ globulines qui se maintiennent à un taux élevé plus d'un mois après la greffe (Pl. 23).

- Après le 21e jour, la masse cellulaire qui avait envahi le greffon disparaît, remplacée par des fibres conjonctives, encore lâches vers le 21e jour, mais qui prennent un aspect plus dense au bout d'un mois. Seule persiste la partie conjonctive du greffon, ainsi que quelques cellules pigmentaires.

3) Homogreffes de peau.

Les homogreffes de peau provoquent une réaction comparable de rejet. Nous n'avons pas suivi dans ce cas les modifications des γ et β globulines sériques. Ces expériences ont surtout été faites pour étudier le recrutement des cellules actives lors de la résorption d'un greffon.

RESUME ET CONCLUSION DU CHAPITRE IV.

Le têtard d'Alytes obstetricans est capable de discerner entre ses propres tissus et les tissus étrangers, même lorsqu'ils proviennent d'animaux de la même espèce.

Il peut préserver son intégrité soit par des moyens naturels non spécifiques, soit par une réponse d'immunité acquise qui se traduit, comme chez les Vertébrés supérieurs, par l'apparition de cellules productrices d'anticorps spécifiques.

Dans le chapitre suivant, nous chercherons quelle est la nature de ces anticorps et de ces cellules, et ensuite quelle est l'origine des cellules productrices d'anticorps.

CHAPITRE V

NATURE DES ANTICORPS ET DES CELLULES INTERVENANT DANS LES MECANISMES D'IMMUNITE ACQUISE. RECRUTEMENT DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

CHAPITRE V

NATURE DES ANTICORPS ET DES CELLULES INTERVENANT DANS LES MECANISMES D'IMMUNITE ACQUISE. RECRUTEMENT DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

I.- NATURE DES ANTICORPS.

A - CARACTERISATION DES ANTICORPS PRESENTS DANS UN IMMUNSERUM HEMOLYTIQUE.

En raison de la faible quantité de protéines contenues dans le sérum des larves et de la difficulté de s'en procurer, nous avons recherché les anticorps hémolytiques chez les adultes de Rana esculenta et d'Alytes obstetricans après nous être assuré que leur réponse cellulaire était identique à celle des larves.

Le sérum d'adultes immunisés avec des hématies de mouton est soumis à une analyse immuno-électrophorétique en agarose. On opère ensuite comme pour la recherche des hémolysines naturelles (chapitre III).

Après la migration,on coule à la surface de la lame une couche d'agarose au sang de mouton et on remplit la rigole d'immunsérum. La diffusion est alors possible dans le sens vertical et les anticorps anti hématies. peuvent diffuser dans l'agarose au sang et y sensibiliser les hématies. L'addition de complément de cobaye à la surface de la lame provoque alors la lyse de ces hématies sensibilisées, déterminant une zone d'hémolyse partiellement limitée par l'arc de précipitation de l'anticorps hémolytique. L'observation de la lame avant et après l'addition de complément de cobaye permet de distinguer l'hémolyse due aux anticorps de l'hémolyse due au facteur cytolytique naturel.

Après deux injections d'hématies de mouton les anticorps sont localisés dans deux classes de globulines comme le montre l'observation de la figure 1 de la planche 21.

On distingue en effet deux zones d'hémolyse bien distinctes.

1°) La première est floue et est provoquée par une β globuline très peu abondante que sa faible mobilité électrophorétique ferait ranger parmi les γ globulines de Mammifères ou les β_2. La diffusibilité de cet anticorps est faible. Il reste pratiquement sur l'axe de migration et la zone d'hémolyse n'est pas large. Ce fait permettrait de lui attribuer un poids moléculaire élevé.

En bref, sa mobilité électrophorétique et sa diffusibilité nous permettent de rapprocher cette immunoglobuline d'Amphibien des IgM (19 S) de Mammifères.

2°) Il existe aussi une deuxième zone d'hémolyse beaucoup plus ténue, strictement superposée à l'arc de précipitation des γ globulines (Pl.21, fig.1).

Nous pensons qu'il s'agit d'anticorps peu hémolytiques, mais dont l'effet est accentué par l'action de l'immunsérum anti globulines d'Amphibien et fixation du complément sur le complexe antigène-anticorps ainsi formé. C'est ce phénomène qui a été exploité par DRESSER et WORTIS et par STERZL et RIHA (1965) pour détecter, avec la méthode d'hémolyse locale, les anticorps peu hémolytiques de type Ig G (7 S) chez la souris. En fait on ignore encore par quel mécanisme l'action du sérum anti globulines rend les anticorps anti hématies capables de fixer le complément. Chez les Mammifères, seules les IgG anti IgG exaltent l'activité hémolytique. Il semble que le complexe plurimoléculaire ainsi formé fixe plus facilement le complément.

Grâce à cette propriété et à sa mobilité électrophorétique nous sommes tentés de rapprocher cette deuxième immunoglobuline des IgG de Mammifères.

B - ETUDE ELECTROPHORETIQUE DU SERUM DES ANIMAUX IMMUNISES AVEC DES PROTEINES ISOGENIQUES OU PORTEURS D'UNE HOMOGREFFE.

1°) Le sérum des têtards ayant donné une réaction positive de précipitation en gélose a été soumis à l'électrophorèse. Le protéinogramme de ces animaux montre une très forte augmentation de la quantité de β globulines (Pl. 24, fig. 2).

2°) Nous avons relaté au chapitre précédent les aspects humoraux de l'intolérance aux homogreffes chez le têtard. Nous n'avons aucune preuve du rôle de ces protéines dans le rejet des greffes, mais il est intéressant de constater, dans ce phénomène d'immunité acquise, la modification des deux classes de globulines β et γ, comme dans le cas d'une immunisation avec des hématies de mouton.

C - ACTION DU SERUM ANTIGLOBULINES SUR LA FORMATION DES ROSETTES.

Le sérum antiglobulines (I. S_1) dont la préparation a été décrite au chapitre I a été mélangé à la suspension de cellules spléniques provenant d'animaux immunisés. Après une heure d'exposition à 2° C, les cellules ont été soumises au test de l'I.C.A. en présence d'hématies de mouton utilisées comme antigène. Nous avons obtenu les résultats suivants (tableau 9) :

Nombre témoin de rosettes animaux immunisés 5 jours		Après action de l'antisérum anti-globulines décomplémenté
$80/10^5$	Dilution 1/50	$18/10^5$
$80/10^5$	" 1/10	$8/10^5$

TABLEAU 9

Le sérum antiglobulines inhibe dans une forte proportion la formation des rosettes chez les animaux immunisés. Ce résultat confirme la nature globulinique des anticorps provoquant la formation des rosettes.

D - ACTION DU MERCAPTO-ETHANOL SUR LA FORMATION DES PLAGES DE LYSE.

Chez les Mammifères le mercapto-éthanol a la propriété d'inhiber l'hémolyse due aux IgM et non celle due aux IgG car il inactive électivement les macromolécules d'IgM en réduisant les ponts disulfure .

Chez le têtard, l'addition de mercapto-éthanol,à la concentration finale de 0,03 M dans le milieu de culture, provoque une inhibition complète de la formation des plages de lyse.

Par analogie, ce résultat permettrait d'attribuer une nature macro-globulinique aux anticorps du têtard d'Amphibiens et d'en faire sans trop d'invraisemblance les homologues des IgM de Vertébrés supérieurs.

En résumé, nos résultats confirment et précisent les travaux exécutés, chez les adultes seulement, par DIENER et NOSSAL (1966), LYKAKIS (1969), MARCHALONIS et EDELMAN (1966).

Il existe donc deux classes d'immunoglobulines chez les Amphibiens même larvaires, comme chez les Vertébrés supérieurs.

Il semble que la majeure partie des anticorps hémolytiques après une seule injection de globules rouges soient des anticorps homologues des IgM de Mammifères, comme chez l'adulte de Rana catesbiana (MARCHALONIS et EDELMAN, 1966).

II.- NATURE DES CELLULES ACTIVES DANS LES REACTIONS IMMUNITAIRES.

A - LES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS APRES UNE IMMUNISATION.

1°) Cellules productrices étudiées in vitro.

La technique des plages de lyse en phase liquide se prête très bien à l'étude qualitative des cellules productrices d'anticorps, sans aucune ambiguïté d'interprétation.

Après l'avoir sortie de l'étuve à 30° C, on place la préparation sous le microscope à contraste de phase et contraste interférentiel équipé d'un dispositif de prise de vue cinématographique.

En général on repère aisément la cellule qui se trouve au centre de la plage de lyse. Dans certains cas la densité cellulaire de la préparation est telle que l'on aperçoit plusieurs cellules lymphoïdes à l'intérieur de la plage et il est difficile de repérer la cellule productrice à cause de l'instabilité de la préparation en phase liquide. Nous avons remarqué dans ce cas que les cellules productrices d'anticorps formaient des "rosettes" avec les stromas des hématies lysées. Ceci aide à leur identification et constitue, en outre, une nouvelle preuve de l'absence de fixation passive d'anticorps (in vitro) sur des cellules spléniques normales. En effet, aucune autre cellule que la cellule productrice ne forme de rosettes avec les stromas.

Une fois reconnue, la cellule peut être filmée, photographiée. La majorité de ces cellules est de grande taille (15 µ). Ce sont des cellules lymphoïdes présentant des aspects très variés, allant du lymphoblaste au plasmocyte. Ces cellules sont animées de mouvements cytoplasmiques intenses, à la différence des cellules non productrices qui les entourent. Elles ne se déplacent pourtant pas. Ces mouvements peuvent bien être mis en évidence par la prise de vue cinématographique image par image.

La méthode des rosettes ne permet pas de suivre la production des anticorps par la cellule. Cependant l'examen entre lame et lamelle des cellules formatrices de rosettes (C.F.R.) confirme l'identification précédente des cellules productrices d'anticorps : ce sont surtout des lymphoblastes (Pl. 25, 26).

Malheureusement, l'observation vitale ne permet pas l'étude détaillée des types cellulaires : l'observation de préparations fixées et l'histologie nous renseignent mieux.

2°) Préparations fixées :

a) Coloration des C.F.R. : un avantage de la méthode des rosettes réside dans la possibilité qu'elle offre de récupérer les cellules produc-

trices d'anticorps, d'en faire un frottis et de les colorer. Pour cela on centrifuge la suspension contenant les rosettes et on remplace le milieu tamponné par du sérum de grenouille ayant été chauffé à 56° C pendant 25 mn, traitement qui évite la formationde cristaux lorsque le frottis sèche. Le volume de la préparation (0, 05 ml) est disposé au centre d'une lame de microscope que l'on centrifuge ensuite à plat autour de son centre. Cette centrifugation étale les cellules à la surface de la lame. Après séchage on fixe à l'alcool - éther et on colore au Giemsa (BIOZZI, communication personnelle).

Cette observation permet de confirmer, après une injection unique d'hématies, le petit nombre de cellules plasmocytaires à noyau excentré et cytoplasme très basophile. Dans ce cas les cellules productrices d'anticorps sont surtout des lymphoblastes à noyau très volumineux et clair. Leur cytoplasme est peu abondant et peu basophile.

b) Immunofluorescence : les études d'immunofluorescence ont été faites chez des animaux immunisés par une série d'injections de protéines. Les organes ont été étudiés 15 jours après la dernière injection.

Nous avons observé les cellules productrices d'anticorps antiglobulines de lapin surtout dans le foie et le mésonéphros. Dans la rate, la détection de cellules productrices a été occasionnelle par cette méthode, peut-être en raison du programme d'immunisation, de la nature de l'antigène ou de la dose administrée.

Après une hyperimmunisation de cette sorte les cellules ont le plus souvent l'aspect de plasmocytes ou de plasmocytoblastes. La fluorescence immunologique est localisée dans le cytoplasme de façon plus ou moins homogène (Pl. 26, fig. 6, 7, 8). A plusieurs reprises nous avons détecté ces cellules groupées en flot dans l'organe producteur. C'est surtout net dans le foie.

3°) En résumé, les cellules productrices d'anticorps sont des cellules lymphoïdes dont l'aspect peut varier. Elles sont nombreuses surtout dans le foie, les reins et la rate. Le type dominant de cellule productrice n'est pas le même après une immunisation simple (1 injection) et après une hyperimmunisation.

Dans le premier cas, les cellules sont surtout des lymphoblastes; dans le second cas on rencontre souvent des plasmocytes.

B - LES CELLULES VECTRICES D'ANTICORPS.

Chez les Mammifères, il existe au cours de la réponse immunitaire certaines cellules (macrophages en particulier) qui ne produisent pas d'anticorps mais qui les véhiculent après les avoir adsorbés sur leur membrane. Ces anticorps sont appelés cytophiles par les auteurs de leur découverte (BOYDEN et col., 1960). Nous avons pu mettre en évidence un phénomène de ce genre chez le têtard.

En effet, nous avons été surpris par le taux très élevé de cellules formatrices de rosettes (C.F.R.) parmi les cellules du liquide péritonéal, après une injection de globules rouges. Au contraire nous ne parvenions pas à mettre en évidence de cellules formant des plages de lyse (C.F.P.).

En outre, nous avons remarqué que l'augmentation du aux de C.F.R. dans le liquide péritonéal suivait à peu près la même courbe que la réaction correspondante des cellules spléniques (Pl. 27, fig. 2; Pl. 28).

Nous avons donc exécuté plusieurs séries d'expériences pour trouver la nature de ces C.F.R. péritonéales.

1°) Observation in vitro : ces cellules ont l'aspect de macrophages, leur taille est grande, elles collent au verre et se déplacent avec les hématies agglutinées à leur membrane.

2°) Destruction par un sérum antiglobulines .- En utilisant du sérum de lapin anti globulines de têtard en présence de complément, on peut obtenir la destruction élective par cytolyse des macrophages et de nombreux leucocytes péritonéaux. Cette lyse n'atteint pas les hématies ni les granulocytes. Le déroulement de la lyse s'observe de la façon suivante : une goutte de sérum de lapin anti globulines de têtard, diluée au 1/10, est mise en contact avec une goutte de liquide péritonéal. Le mélange est observé entre lame et lamelle. Au bout de quelques secondes les cellules affectées émettent des pseudopodes selon un mouvement tournant et sans se déplacer. Cette phase précède l'éclatement de la cellule (Pl. 24, fig. 1).

Nous pensons que la lyse est due à une réaction antigène-anticorps à la surface de la cellule, suivie de l'action lytique du complément. En effet le sérum chauffé ne provoque aucune lyse. Ce résultat prouverait l'existence de globulines à la surface des cellules.

3°) Comparaison entre l'évolution de la protéinémie et l'apparition des rosettes dans le liquide péritonéal.- L'analyse immuno-électrophorétique du liquide péritonéal au cours d'une immunisation montre que la quantité de γ globulines y augmente après une injection de globules rouges (Pl. 27, fig. 1), ce qui se traduit par l'augmentation du pouvoir d'hémolyse du liquide péritonéal relatée au chapitre précédent. Il est probable que parmi ces γ globulines humorales se trouvent des γ globulines cytophiles.

4°) En résumé, il existe chez le têtard immunisé un processus de fixation passive des anticorps qui augmente le nombre de cellules pouvant réagir avec l'antigène.

C - LE PROBLEME DES C.F.R. ET DES C.F.P. NATURELLES.

Les techniques d'immuno-cyto-adhérence et d'hémolyse locale étant destinées à l'étude des cellules productrices d'anticorps, nous avons évi-

demment tendance à considérer les C.F.R. et les C.F.P. naturelles comme des cellules "naturellement" productrices d'anticorps anti-globules rouges.

1°) Cas des C.F.P. naturelles : elles sont rarissimes chez le têtard et il s'agit sans aucun doute de lymphocytes producteurs d'anticorps. Leur présence peut être due à une immunisation naturelle de l'animal par un antigène que l'on retrouve sur les hématies. Elle peut être aussi due à une différenciation obéissant à un mécanisme génétique interne du têtard.

2°) Cas des C.F.R. naturelles : elles sont beaucoup plus nombreuses et l'ambiguïté qui persiste malgré tout sur la formation des rosettes nous oblige à étudier de plus près les C.F.R. naturelles. En effet il pourrait s'agir
- de macrophages ayant adsorbé des anticorps naturels anti-globules rouges,
- de cellules naturellement productrices d'anticorps,
- de cellules réagissant naturellement avec les antigènes par un mécanisme inconnu.

Compte tenu de l'existence de C.F.P. naturelles et de la différence de sensibilité des méthodes de détection, il semble certain qu'un faible pourcentage de C.F.R. naturelles soit constitué de cellules naturellement productrices d'anticorps. Le reste est-il composé de macrophages ayant fixé passivement des anticorps ?

a) Morphologie : la morphologie des macrophages typiques du liquide péritonéal et des C.F.R. naturelles de la rate n'est pas la même. Les macrophages sont de grandes cellules (18 à 20 µ) mobiles, qui adhèrent rapidement au verre lorsqu'on les observe entre lame et lamelle.

Les C.F.R. naturelles sont des petits lymphocytes dans la plupart des cas (10 µ) mais peuvent atteindre parfois 15 µ de diamètre. Elles n'adhèrent pas au verre (Pl. 26, fig. 1).

b) Comportement in vitro : le comportement de ces deux derniers types de cellules n'est pas le même in vitro comme le montre l'expérience suivante.

Des cellules spléniques normales ont été soumises au test de l'I.C.A. avec des hématies de mouton en milieu de Eagle, mais à 30° C au lieu des 2° C habituels. Après 5 h d'incubation à cette température, rosettes et phagocytoses sont comptées. Nous avons alors constaté que le nombre des rosettes était sensiblement le même après un séjour à 30° C qu'à 2° C. En revanche le nombre de phagocytoses était considérable à 30° C alors qu'il était nul ou faible à 2° C. Le tableau 10 donne les résultats :

	2° C	30° C
Nombre de rosettes pour 10^5 cell.spl.	$12,4 \pm 5,4/10^5$	$14 \pm 4/10^5$
Nombre de phagocytoses	-	$990 \pm 24/10^5$
intervalle de confiance 95%		

TABLEAU 10

Si les cellules formatrices de rosettes avaient été des macrophages, nous pensons qu'à la température de 30°C favorable à l'activité cellulaire, les rosettes auraient dû disparaître au profit des phagocytoses. En effet, la fixation des hématies sur la membrane n'est que la première phase de la phagocytose. Or dans nos expériences il reste toujours un même nombre de C.F.R. après une incubation à 30° C.

Pour prouver qu'il s'agit bien des mêmes cellules avant et après incubation, nous avons fait l'expérience suivante : un test d'I.C.A. est fait normalement à 2° C et les C.F.R. sont comptées, la place de chaque C.F.R. étant repérée avec le vernier de la platine. Les préparations sont alors lutées à la paraffine et placées à 30° C, pendant quelques heures. On passe ensuite en revue les C.F.R. repérées et on compte les images de phagocytoses. Dans tous les cas observés, les C.F.R. naturelles retrouvées n'avaient pas phagocyté leurs globules rouges.

Pour toutes ces raisons nous estimons que les C.F.R. naturelles ne sont pas assimilables directement à des macrophages. Cependant il n'est pas impossible qu'il s'agisse de cellules de la même lignée et que le mécanisme de fixation à la surface des cellules soit identique dans les deux cas. Cette fixation est-elle due à la fixation passive d'anticorps naturels sur les cellules ? Pour le vérifier nous avons pratiqué les expériences suivantes :

c) Action du sérum anti-globulines sur les C.F.R. naturelles : comme le montre le tableau 11, le sérum de lapin anti-globulines de têtard inhibe en partie la formation des rosettes naturelles.

	Taux de C.F.R. naturelles anti hématies humaines mesuré sur des rates de 100 à 125.000 cellules pour 10^5 cell.spl.	
Lots	Témoins	Après action du sérum anti-globulines dilué au 1/10 et décomplémenté
1	$90/10^5$	$47/10^5$
2	$95/10^5$	$28/10^5$

TABLEAU 11

Une partie au moins des C.F.R. naturelles est donc constituée de cellules possédant vraisemblablement à leur surface des protéines ayant une affinité pour les antigènes des hématies humaines. Le pourcentage d'inhibition est cependant moins fort que dans le cas des C.F.R. comptées après immunisation.

d) Fixation de plusieurs types de globules rouges sur la même cellule : si on admet l'hypothèse d'une fixation passive d'anticorps sur des cellules, on peut admettre que plusieurs anticorps de spécificités différentes peuvent se fixer sur les membranes des macrophages. En conséquence, la technique des rosettes devrait permettre la détection de cellules formant des rosettes avec plusieurs types de globules rouges (rosettes mixtes) ayant un assortiment de groupements antigéniques différents. Ceci a été observé sur des macrophages de souris (BIOZZI, 1967).

Chez le têtard nous avons donc soumis les cellules spléniques normales au test de l'I.C.A. en présence de deux types d'hématies qui ne donnaient pas de réaction croisée chez les animaux immunisés, les hématies de mouton et les hématies humaines (groupe B) facilement reconnaissables grâce à leur différence de taille.

Nous avons recherché dans les préparations les cellules ayant réagi avec les deux types de globules rouges. Les résultats sont groupés dans le tableau 12 :

Nb Cell. spl.	Rosettes G.R.M.	Rosettes G.R.H.	Rosettes mixtes
20.000	1	5	2
85.000	4	16	4
26.500	6	21	8
31.000	8	18	7
18.000	2	13	5
18.000	5	15	10
7.000	10	12	11
37.000	1	8	2
4.500	0	2	1

TABLEAU 12

Ces résultats prouvent la constance de l'existence de rosettes mixtes parmi les C.F.R. naturelles dans une proportion qui varie de 16 à 30%. Cette proportion est beaucoup plus forte que celle qui existe chez les animaux immunisés (10%, voir chapitre précédent, 1ère partie, II C.a).

e) Conclusion sur les cellules formant naturellement des rosettes (C.F.R. naturelles) : nous pensons que les C.F.R. naturelles constituent une population assez hétérogène comprenant au moins trois types de cellules : quelques cellules naturellement productrices; des cellules ayant

fixé passivement des protéines à affinité pour divers antigènes et des cellules dont nous ignorons le mécanisme de liaison avec l'antigène.

Le problème de l'assimilation des C.F.R. à des macrophages nous paraît secondaire, puisque la fonction de phagocytose ne caractérise pas un type cellulaire défini.

III.- MODE DE RECRUTEMENT DES CELLULES ACTIVES DANS LES REACTIONS IMMUNITAIRES.

Les réactions immunitaires chez le têtard d'Alytes se traduisent par deux phénomènes cellulaires principaux :

- une augmentation du nombre absolu de cellules,

- une augmentation à l'intérieur de cette population du taux de cellules spécifiquement actives.

A - AUGMENTATION DU NOMBRE ABSOLU DE CELLULES.

Les résultats relatés dans ce paragraphe ont été obtenus par les méthodes d'histologie classique .

1°) Augmentation locale du nombre de cellules au site d'injection.

a) Cas d'un greffon : lors du rejet d'un greffon, on peut observer la constitution d'une masse de cellules leucocytaires qui se forme au début par l'arrivée de cellules sanguines. Par la suite, l'augmentation de la masse de cellules actives est due à des divisions locales. Le nombre de figures de mitose est très important (Pl. 29, fig. 4). Etant donné l'hétérogénéité de la population cellulaire lympho-myéloïde il est difficile de dire avec précision quels sont les types de cellules qui se divisent. L'observation de la masse cellulaire totale montre que les lymphocytes et les cellules histiocytaires sont les plus abondants. C'est donc parmi ces cellules que se produit le plus grand nombre de divisions.

A titre indicatif, au paroxysme de la réaction, cette prolifération cellulaire provoque la formation d'une masse de 3×10^5 cellules pour un greffon de peau de 2 mm^2, alors que la rate n'en contient que 1×10^5 chez l'animal considéré.

b) Cas d'une injection : une injection intrapéritonéale d'antigène provoque une forte augmentation du nombre de cellules du liquide péritonéal (c hapitre précédent, Pl. 19). L'addition d'adjuvant complet de Freund à l'antigène accentue encore la prolifération cellulaire et permet de mieux situer son origine.

Les coupes histologiques des animaux soumis à une telle injec-

tion montrent une forte concentration de cellules autour du foie et des nodules lympho-myéloïdes du mésentère.

Dans le foie, il y a continuité entre les cellules de la couche hématopoïétique périphérique et les cellules du liquide péritonéal. Par diapédèse, une partie des cellules provenant des divisions intrahépatiques gagnent le liquide péritonéal où elles deviennent actives en phagocytant les antigènes. Dans le cas d'une injection d'antigène émulsionné dans l'adjuvant de Freund (huile de paraffine + Bacilles de Koch tués), on distingue facilement les cellules qui ont phagocyté de grosses gouttelettes d'huile de paraffine (Pl. 12, fig. 5).

Beaucoup de cellules issues de ces divisions restent dans le foie, ce qui provoque un épaississement considérable de la couche hématopoïétique (Pl. 29, fig. 2 et 3).

2°) Multiplications cellulaires dans les centres du complexe lympho-myéloïde.

a) Splénomégalie : nous avons déjà signalé (chapitre précédent et Pl. 13) l'augmentation de volume de la rate après l'introduction de globules rouges dans l'organisme.

b) Foyers de multiplication cellulaire dans le foie : après une greffe, ou après une injection d'antigènes quelconques, on observe dans le foie de nombreux foyers de multiplication cellulaire. Leur aspect est nodulaire (Pl. 29, fig. 1) et les types cellulaires que l'on y rencontre sont variés. Les figures de mitoses sont fréquentes ce qui montre bien que l'on a affaire à une masse cellulaire en évolution et non à un rassemblement de cellules ordinaires. On ne détecte pas de formations semblables chez les animaux normaux.

Avec les méthodes d'immunofluorescence nous avons pu y déceler quelques cellules productrices d'anticorps.

c) Dans les autres organes, et en particulier dans les reins, la multiplication cellulaire qui survient après l'introduction d'un antigène est moins intense. On observe seulement l'augmentation de la densité cellulaire dans le tissu intertubulaire.

3°)En résumé, après l'introduction d'un greffon ou d'un antigène ordinaire, des divisions cellulaires nombreuses interviennent au sein du complexe lympho-myéloïde et provoquent une augmentation du nombre des cellules aussi bien au site de l'injection ou de la greffe que dans les centres du complexe.

B - AUGMENTATION DU TAUX DE CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

Nous analyserons ce phénomène en considérant essentiellement les résultats obtenus après une injection intra-cardiaque d'hématies de mouton et l'utilisation de la technique d'hémolyse locale. En effet, il importe d'être ab-

solument sûr que la courbe d'augmentation à analyser ne concerne que des cellules productrices d'anticorps.

Dans le cas des cellules qui forment des rosettes, l'importance du taux de rosettes naturelles peut masquer le début de la réaction immunitaire. L'analyse de la courbe est donc délicate. Il est difficile de la considérer comme une exponentielle. Chez les Mammifères, BIOZZI a montré que l'intensité de la réponse d'immunité acquise ne dépendait pas du taux des C.F.R. naturelles. En conséquence, pour obtenir les courbes d'augmentation du nombre de C.F.R. il soustrait à chaque nombre obtenu le nombre de C.F.R. naturelles. Nous ignorons chez le têtard le rôle des C.F.R. naturelles dans la réponse immunitaire spécifique. Nous avons simplement constaté qu'il existait un lien entre l'intensité de la réponse envers un antigène et le taux de C.F.R. naturelles à l'égard de cet antigène. Il ne nous paraît donc pas possible de retrancher le nombre de C.F.R. naturelles. Nous l'avons fait à titre indicatif, mais l'interprétation des courbes est tout aussi délicate. Nous ne discuterons donc que les résultats obtenus avec la méthode des plages de lyse. Dans ce cas, la courbe d'augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps a une allure exponentielle, mais seulement à partir du 2e jour (Pl. 30, fig. 1).

On peut interpréter ces courbes de deux façons.

On peut y voir le résultat des divisions d'une cellule souche dont la descendance serait productrice d'un même type d'anticorps spécifique.

On peut y voir le résultat d'une différenciation en chaîne grâce à un processus de relations et de contact entre les cellules.

Nos résultats ne nous permettent guère de trancher cette question fondamentale. En effet nous avons observé parfois, grâce à la technique d'immunofluorescence, des cellules en mitose qui produisaient des anticorps (Pl. 30, fig. 2). En outre, des interactions entre cellules semblent se produire après une immunisation. C'est ainsi que l'on trouve des granulocytes éosinophiles dans le thymus des animaux immunisés ou porteurs d'une greffe et non chez les témoins (Pl. 30, fig. 3). On peut aussi observer des associations macrophages-lymphocytes dans la rate de têtards immunisés.

En résumé, au cours d'une réponse d'immunité acquise, le nombre des cellules lymphoïdes augmente localement au site de l'injection de l'antigène, grâce à un apport de cellules et par des divisions cellulaires locales. On observe aussi des divisions dans les centres du complexe lymphoïde.

IV.- RESUME ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE V.

L'analyse du sérum des animaux immunisés avec divers antigènes érythrocytaires a montré qu'il existait chez les Amphibiens deux classes d'immunoglobulines, comme chez les Mammifères (IgM et IgG).

Ces protéines, à fonction d'anticorps, sont synthétisées par des cellules lymphoïdes dont la morphologie est variable et suggère l'existence de transformations d'un type cellulaire à l'autre.

En outre, il semble qu'une partie des anticorps circulants puisse se fixer sur des cellules histiocytaires libres comme les monocytes et les macrophages. Ce mécanisme a pour effet d'augmenter le nombre de cellules capables de réagir avec les antigènes.

Chez l'animal normal, avant toute immunisation, il existe des cellules qui réagissent avec les antigènes par des moyens dont nous n'avons pas pu élucider clairement la nature.

Le nombre de cellules lymphoïdes et de cellules productrices d'anticorps augmente après une immunisation. Le mécanisme de l'augmentation des seules cellules productrices est dû en partie à des divisions cellulaires, mais il est encore impossible de dire si c'est le seul mécanisme existant.

Le chapitre suivant, qui traite de l'apparition des cellules immunologiquement compétentes au cours de l'ontogenèse du complexe lymphomyéloïde, nous apporte quelques informations supplémentaires et significatives.

. . .

CHAPITRE VII

ONTOGENESE DE L'IMMUNITE.

APPARITION DES REACTIONS D'IMMUNITE ACQUISE AU COURS DE L'ONTOGENESE.

CHAPITRE VI

ONTOGENESE DE L'IMMUNITE.

APPARITION DES REACTIONS D'IMMUNITE ACQUISE AU COURS DE L'ONTOGENESE.

Il existe chez les jeunes têtards une période pendant laquelle ils ne sont apparemment pas capables de synthétiser des anticorps ni de résorber des homogreffes. Puis, environ un mois ou deux mois et demi après l'éclosion, on peut provoquer chez eux la formation d'anticorps et observer le rejet des homogreffes.

C'est cette acquisition de l'aptitude à donner des réactions d'immunité acquise que nous allons essayer d'analyser maintenant.

I.- PERIODE DE TOLERANCE AUX GREFFES ET D'INAPTITUDE A SYNTHETISER DES ANTICORPS.

Durant le premier mois de vie larvaire nous avons pratiqué des homogreffes et des injections d'antigène à des têtards.

A - TOLERANCE AUX HOMOGREFFES.

Nous avons pu réaliser la greffe durable de l'extrémité de la queue chez de jeunes têtards d'Alytes (DU PASQUIER, 1965). Chez les têtards de cet âge, la queue, de faible épaisseur, présente une grande surface par rapport à son volume. La respiration par diffusion est donc suffisante, ce qui permet au greffon d'attendre le rétablissement de la circulation sanguine qui intervient le deuxième jour. Dans ces conditions nous avons observé des survies durables (jusqu'à la métamorphose). L'animal est donc devenu tolérant aux tissus greffés.

B - INAPTITUDE A SYNTHETISER DES ANTICORPS.

Chez les têtards d'un mois, nous ne sommes pas parvenus à obtenir une synthèse détectable d'anticorps. La technique des rosettes, pourtant sensible, ne révèle aucune augmentation du nombre des C.F.R. par rapport au taux de C.F.R. naturelles.

C - ETAT DU COMPLEXE LYMPHO-MYELOIDE CHEZ CES ANIMAUX.

Nous avons recherché la cause de ces phénomènes dans l'état du complexe lympho-myéloïde des animaux tolérants.

Tous les organes que nous avons décrits sont en place. La seule différence avec les animaux plus âgés réside dans le nombre de cellules des organes. La rate par exemple, chez ces jeunes animaux, ne contient que 500 à 7.000 cellules lymphoïdes, alors qu'elle en contient 10 fois plus chez les animaux plus âgés. On peut estimer à environ $2,5 \times 10^5$ le nombre de lymphocytes existant dans tout l'animal à ce stade.

Nous avons mesuré le taux de C.F.R. naturelles dans ces petites rates et avons été surpris de voir qu'il était beaucoup plus élevé que chez les animaux plus âgés. En effet, quel que soit le nombre de cellules contenues dans la rate, il y en a toujours au moins une qui réagit et forme une rosette avec les globules rouges d'homme ou de mouton (Pl. 31).

II.- APPARITION DES REPONSES AUX STIMULI ANTIGENIQUES.

Au cours de la vie larvaire, à partir du 2ème mois, les têtards acquièrent la possibilité de rejeter les homogreffes et de synthétiser des anticorps.

L'injection d'hématies d'homme ou de mouton au cours de l'ontogenèse permet de savoir exactement à quel moment l'animal devient stimulable. Nous avons donc suivi l'apparition des cellules productrices d'anticorps dans la rate avec la méthode des plages de lyse. Nous avons aussi employé la méthode des rosettes en comparant le taux de C.F.R. après immunisation au taux de C.F.R. naturelles.

En pratique, ce travail revient à étudier l'apparition des cellules productrices d'anticorps au cours de l'ontogenèse de la rate.

La taille de la rate pouvant varier considérablement d'un individu à l'autre, nous rapporterons les résultats, non pas en fonction de l'âge exact de la rate, mais de son nombre de cellules.

A - EVOLUTION DU TAUX DES C.F.R. NATURELLES AU COURS DE L'ONTOGENESE DE LA RATE.

Cette évolution a été suivie en comptant les C.F.R. naturelles anti hématies humaines dans la rate de 104 têtards. Le nombre de cellules dans la rate variait grossièrement de 750 à 120.000 en fonction de l'âge et de la taille des animaux.

Les mesures ont été effectuées soit sur des rates isolées, soit sur des groupes de rates contenant le même nombre de cellules.

Les témoins ont été faits sur des suspensions de 750 à 120.000 cellules prises dans des rates d'adultes ou d'animaux proches de la métamorphose et contenant 5×10^5 à 4×10^6 cellules lymphoïdes.

Les résultats obtenus figurent sur la planche 31.

Si l'on emploie des hématies ovines le même phénomène se produit. Nous l'avons moins étudié puisque nous ne l'avons suivi que dans les rates de 7.000 à 80.000 cellules.

La courbe montre que le taux de C.F.R. naturelles anti G.R.H. décroît lorsque le nombre de cellules spléniques augmente. Cette décroissance relative s'arrête lorsque les rates atteignent environ 10 à 15.000 cellules. A ce moment le taux de C.F.R. naturelles devient constant quelle que soit la taille de la rate. Nous retiendrons surtout que, quel que soit son volume et son âge, la rate contient toujours des cellules qui réagissent avec l'antigène.

B - EFFETS DES STIMULATIONS ANTIGENIQUES AU COURS DE L'ONTOGENESE.

60 animaux du stade IV_6 au stade IV_{12} ont été immunisés par une injection intracardiaque de 7×10^5 hématies humaines/g de poids du corps et les rosettes ont été comptées dans chaque rate pendant l'immunisation. 30 autres animaux ont reçu une injection intracardiaque de 7×10^6 hématies de mouton/g de poids du corps et les cellules spléniques ont été soumises au test des plages de lyse.

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 13.

Avec la méthode des rosettes, nous considérons comme preuve d'une synthèse d'anticorps les valeurs qui se trouvent au-delà de la limite supérieure du taux de rosettes naturelles. Avec la méthode d'hémolyse locale, l'apparition d'une seule plage de lyse est le signe d'une synthèse provoquée d'anticorps puisqu'il n'y a pas de C.F.P. naturelles.

En considérant l'ensemble des résultats du tableau, on peut dire que l'aptitude des cellules spléniques à produire des anticorps apparaît lorsque leur nombre atteint 6.000 à 13.000. Ceci se produit en général au cours des deux premiers mois de vie larvaire. Les résultats obtenus avec

Nombre de cellules spléniques	Limite du taux de C.F.R. naturelles anti G.R.H. (/10^5 cell.) 95% intervalle conf.	Nombre max. C.F.R. anti G.R.H. chez animaux immunisés (/10^5 cell.) valeurs isolées	Nombre max. C.F.P. anti G.R.M. chez animaux immunisés valeurs isolées	Age approximat.
2.500	400 - 700	440, 600	-	1 mois
3.500	260 - 575	360, 400	-	
6.000	175 - 300	620, 220	0, 0, 0	
7.000	175 - 300	450, 220, 420, 400	-	
8.000	175 - 275	295, 200, 145	0 - 1	
10.000	100 - 270	500, 212	1	
12.000	75 - 175	130	-	2 mois
13.000	75 - 175	380, 220, 320, 205	1	
16.000	60 - 140	300, 290, 320, 287	1	
18.000	"	360, 345	-	
22.000	"	500, 240	-	
24.000	"	550, 580	2	
35.000	"	190, 400, 170	3	
50.000	"	480, 565, 320	7, 3	

TABLEAU 13

Les nombres imprimés en rouge indiquent une réponse positive (synthèse d'anticorps).

les deux méthodes diffèrent légèrement. Nous pensons que cette différence est due à la sensibilité inégale des techniques utilisées.

Si on tient compte du fait que le nombre de cellules spléniques augmente après une injection, ce ne sont pas des rates de 6.000 à 13.000 cellules qui ont été stimulées, mais des rates plus petites de 3.000 à 6.500 cellules environ. Il est intéressant de noter que l'apparition des cellules productrices d'anticorps se situe au moment où le taux de C.F.R. naturelles tend à devenir constant (cf. Pl. 31).

La proportion de cellules productrices d'anticorps ne varie pas considérablement au cours de l'ontogenèse. En particulier elle ne suit pas l'évolution du taux de C.F.R. naturelles. C'est un point important qui nous servira lors de la discussion sur la signification des C.F.R. naturelles.

En résumé, il existe une période critique dans la maturation du système de défenses immunitaires du têtard, celle où le nombre des cellules de la rate passe d'environ 5.000 à 15.000.

Nous avons pensé, à la suite des résultats du chapitre I et des résultats obtenus chez les Vertébrés supérieurs (MILLER, 1962-1965; FRIEDMANN, 1965), que le thymus jouait un rôle dans cette maturation.

III.- ROLE DU THYMUS DANS L' ONTOGENESE DES REACTIONS D'IMMUNITE ACQUISE.

A - TOLERANCE AUX GREFFES CHEZ LES TETARDS THYMECTOMISES.

Nous avons réalisé des homogreffes de tissu musculaire chez des animaux thymectomisés au stade IV_8. Il s'agissait de têtards d'hiver âgés de 4 mois. L'étude a porté sur un lot de 16 animaux qui ont reçu un greffon 21 jours après la thymectomie. Ils ont été fixés par groupe de 4 les 7ème, 12ème, 18ème et 22ème jours après la greffe.

Au cours de la première semaine, il est difficile de distinguer une homogreffe chez un animal normal de celle que porte un animal thymectomisé. L'afflux des cellules lympho-myéloïdes est semblable dans les deux cas.

A partir du 12ème jour, les différences s'accentuent. C'est l'époque du paroxysme de l'attaque cellulaire chez les animaux entiers. Chez l'un des 4 têtards thymoprives fixés à cette date, nous avons observé une réaction analogue, mais les trois autres montraient au contraire un afflux cellulaire plus réduit : cellules lymphoïdes clairsemées, disposées autour du greffon qui conserve son aspect de muscle strié.

A 17 et 22 jours, la différence est plus nette encore (Pl. 32). Alors que la masse du greffon est résorbée chez l'animal pourvu de thymus, nous avons observé sur la majorité des sujets thymectomisés (5 têtards sur 8) un état de tolérance partielle. Le greffon garde son aspect initial, mais est cependant entouré de cellules lymphoïdes en nombre plus grand que dans le cas d'une autogreffe.

Ainsi, sur 16 animaux, 12 présentent une réaction affaiblie aux homogreffes, 4 ont une réaction normale ou proche de la normale. Les réactions humorales consécutives à une greffe chez les têtards thymectomisés sont délicates à interpréter en raison de modifications simplement dues à la thymectomie, qui provoquent une augmentation du taux des immunoglobulines. Nous préférons ne pas rapporter nos observations à ce sujet en raison du petit nombre de résultats obtenus.

B - PRODUCTION D'ANTICORPS CHEZ LE TETARD THYMECTOMISE.

Certains auteurs ont montré que l'ablation du thymus empêchait les têtards de Rana catesbiana de synthétiser des anticorps (COOPER et col., 1964). Nous avons répété ces expériences en utilisant les techniques d'analyse de l'immunologie cellulaire. Ces expériences, toutes récentes, portent encore sur un très petit nombre d'animaux, mais sont, à notre avis, déjà interprétables.

20 têtards âgés de 3 semaines à 2 mois ont été thymectomisés selon la technique déjà décrite (chapitre II).

7 d'entre eux ont été gardés comme témoins pour l'étude du taux des C.F.R. naturelles chez les têtards thymectomisés.

Les autres ont été gardés pour les immunisations. Un mois après la thymectomie 3 d'entre eux sont morts de la maladie décrite au chapitre II. Les 10 restants ont été immunisés, 5 ont reçu des hématies humaines, 5 autres ont reçu des hématies de mouton, par voie intracardiaque. Finalement 3 autres têtards sont morts pendant l'immunisation. Ces résultats préliminaires concernent donc seulement 4 têtards immunisés avec des hématies de mouton et 3 têtards immunisés avec des hématies humaines.

1°) Etude du taux de rosettes naturelles chez des têtards thymectomisés.

Nous n'avons étudié que le taux de C.F.R. naturelles anti hématies. Les résultats obtenus sur chaque têtard, un mois après la thymectomie, sont rapportés sur le tableau n° 14, en fonction du nombre de cellules spléniques. Deux des animaux étaient imparfaitement thymectomisés, comme l'a montré le contrôle histologique.

Taux de C.F.R. naturelles anti hématies humaines chez des têtards d'Alytes thymectomisés.

Nombre de cellules spléniques	Taux normal C.F.R. naturelles Interval. conf. 95 % Nb C.F.R./10^5 cell.spl.	Taux de C.F.R. naturelles chez thymectomisés Valeurs individu. Nb.C.F.R. /10^5 cell.spl.
2.500	400 - 700	40
*8.500	*175 - 275	* 82
11.500	75 - 175	26
*12.000	* 75 - 175	*75
30.000	60 - 140	26
38.000	60 - 140	9
46.000	60 - 140	4

TABLEAU 14

* imparfaitement thymectomisés.

La thymectomie a donc considérablement affecté le taux de rosettes naturelles. Chez les animaux dont le taux de C.F.R. naturelles est normalement sensiblement constant, c'est-à-dire ceux dont le nombre de cellules spléniques varie de 11.500 à 46.000 cellules, la thymectomie réduit du quart environ le nombre de cellules réagissant naturellement avec l'antigène. Le taux moyen de C.F.R. naturelles est en effet de 21 ± 13 (intervalle de confiance 95%) alors qu'il est de 100 ± 40 chez les animaux normaux.

Il est difficile de comparer ces résultats à ceux obtenus chez les Mammifères. En effet, chez ces derniers, on a surtout étudié l'influence de la thymectomie sur les cellules naturellement productrices d'anticorps hémolytiques (HEGE et COLE, 1967). Ces cellules n'existent pas chez le têtard. Chez les Mammifères, la thymectomie n'affecte pas le taux des cellules naturellement productrices . *

2°) Synthèse d'anticorps chez les animaux thymectomisés.

a) Têtards immunisés avec des hématies humaines : nous avons suivi leur réponse avec la technique des rosettes. Les rates des animaux immunisés contenaient 30 à 50.000 cellules.

Le taux moyen de C.F.R. chez les animaux immunisés a été

---

* Nota : Nous devons cependant signaler les résultats tout récents d'E. MOLLER chez la souris (communication personnelle non encore publiée). Elle a constaté une baisse du taux des C.F.R. naturelles d'environ 50% chez les animaux thymectomisés.

évalué à 55 ± 40 C.F.R./10^5 cellules spléniques (Intervalle de confiance 95%). Il est donc très réduit par rapport au taux constaté chez les animaux normaux immunisés : 480 ± 25 C.F.R./10^5 cellules spléniques.

b) Têtards immunisés avec des hématies de mouton : la réponse immunitaire a été suivie avec la technique d'hémolyse locale. Sur les 4 animaux étudiés 2 n'ont pas produit de C.F.P., les deux autres en ont produit chacun une. En moyenne le taux de C.F.P. est donc de 3,2 ± 4/10^5 cellules spléniques au lieu de 10 ± 3 /10^5 chez les animaux normaux.

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau n° 15.

Résultats des immunisations chez des têtards d'Alytes thymectomisés.

Têtards immunisés avec des G.R.M.						Têtards immunisés avec des G.R.H.		
Animal	1	2	3	4		1	2	3
Nb de C.F.P.	0	0	1	1	Nb de C.F.R.	20	9	31
Nb de cell. spl.	13.000	18.000	15.000	15.000		50.000	25.000	30.000
Proportion	0	0	6/10^5	6/10^5		40/10^5	36/10^5	100/10^5
Chiffre tém.	10 ± 3 /10^5					480 ± 25 /10^5		

G.R.M. = globules rouges de mouton. G.R.H. = globules rouges humains.

TABLEAU 15

Malgré le petit nombre de résultats rapportés, nous pensons que les nombres obtenus chez les animaux thymectomisés diffèrent significativement de ceux obtenus chez les animaux normaux.

c) Conclusions et discussion sur l'influence de la thymectomie : les résultats obtenus montrent que la thymectomie diminue l'aptitude des cellules spléniques à produire des anticorps. Ceci confirme les résultats obtenus dans le cas des greffes.

Nos travaux confirment par une autre technique ceux de COOPER et col., tout au moins ceux de 1964. En effet, depuis 1968 COOPER pense que ce sont plutôt les "lymph glands" de Rana catesbiana qui conditionnent, comme la bourse de Fabricius chez les Oiseaux, la synthèse des anticorps. Le thymus régirait, selon COOPER, la capacité de rejeter les greffes. Pourtant, comme il a pu obtenir une inhibition de la synthèse des anticorps par la thymectomie, nous pensons que les "lymph glands" ne condi-

tionnent que secondairement la production des anticorps.

Nous pensons plutôt que,chez le têtard, l'aptitude à rejeter les greffes et l'aptitude à synthétiser les anticorps sont toutes les deux sous la dépendance du thymus.

Nous avons déjà signalé l'absence des "lymph glands" chez le têtard d'Alytes obstetricans, et l'existence, à leur emplacement, de tissu lymphoïde associé au tissu pronéphrétique. La bourse de Fabricius est au contraire associée au tube digestif. Nous serions donc plutôt tenté de rechercher son homologue chez le têtard parmi les formations incluses dans la paroi du tube digestif.

3°) Présence d'hémolysine naturelle chez les animaux thymectomisés.

L'hémolysine naturelle du sérum est normalement présente chez les animaux thymectomisés, du moins pendant la période où ils ne sont pas atteints par la maladie cachectisante. Ceci confirme une fois de plus que cette substance est entièrement indépendante des mécanismes d'immunité acquise.

IV.- DISCUSSION ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI.

Chez les Mammifères, le nouveau-né possède un complexe lymphoïde rudimentaire (FREUND, 1930) qui se développe rapidement au cours des premières semaines de la vie. On observe ainsi l'apparition de la réactivité aux homogreffes (BORAKER et HILDEMANN, 1965), l'augmentation du taux d'anticorps naturels dans le sang et l'apparition de l'aptitude à synthétiser des anticorps après une stimulation antigénique.

Le développement de la compétence immunologique a été moins étudié dans les autres classes de Vertébrés (GOOD et PAPERMASTER, 1964; GOOD et col., 1966).

Les résultats semblent confus chez les Oiseaux (STERZL et SILVERSTEIN, 1966). Selon SOLOMON les embryons de 15 jours seraient déjà capables de répondre à un stimulus antigénique (SOLOMON,1965 - 1968). L'intensité de la réponse augmente avec l'âge (SETO et HENDERSON, 1969).

Chez les Amphibiens,HILDEMANN a montré en 1962 que la capacité de rejeter les homogreffes était subordonnée, dans le cas des larves de Rana catesbiana, au degré de maturité du complexe lymphoïde évalué par son nombre de cellules.

Nos résultats semblent montrer qu'il existe chez la larve d'Alytes deux périodes importantes :

- la première durant laquelle les cellules de l'animal sont incapables de donner de véritables réponses d'immunité acquise mais seulement de se combiner avec divers antigènes (C.F.R. naturelles);

- la deuxième pendant laquelle on peut stimuler les cellules par des antigènes et obtenir une synthèse d'anticorps.

Il n'y a pas de période "neutre" où l'on ne décèle aucune activité.

Pendant ces deux périodes le thymus est nécessaire au bon fonctionnement des cellules immunitaires.

En outre, l'étude de l'apparition des cellules productrices d'anticorps dans la rate d'animaux normaux (neufs) a montré que les rates de jeunes têtards contenant moins de 10.000 cellules étaient stimulables par les antigènes érythrocytaires et que, quel que soit le nombre de cellules dans la rate, elle contenait toujours des cellules capables de réagir avec ces antigènes.

CHAPITRE VII

DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE VII

DISCUSSION GENERALE

I.- RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS.

Après une description sommaire du complexe lympho-myéloïde du têtard d'Alytes obstetricans, nous avons rapporté les résultats d'une étude des réactions immunitaires et de leur ontogenèse chez cet animal.

1°) Nous avons d'abord mis en évidence des réactions non spécifiques d'immunité naturelle faisant intervenir un agent cytolytique humoral, vraisemblablement associé à une lipoprotéine.

2°) L'étude de la répartition dans le têtard immunisé des antigènes solubles et figurés, non soumis à cet agent, montre le rôle important des macrophages dans leur transfert vers les centres du complexe lympho-myéloïde.

3°) L'injection d'antigènes figurés ou solubles entraîne une production d'anticorps apparemment spécifiques. Cette production a été analysée quantitativement au niveau cellulaire. L'étude de l'apparition des cellules productrices d'anticorps dans la rate au cours de l'ontogenèse montre que des rates ne possédant que 5×10^3 à 12×10^3 cellules sont stimulables par les antigènes des hématies de l'homme ou du mouton.

4°) Quel que soit le nombre de cellules présentes dans la rate au cours de son ontogenèse, celle-ci contient toujours des cellules capables de réagir avec un antigène.

5°) Les têtards d'Alytes obstetricans sont en outre capables de résorber des homogreffes de peau ou de muscle dès le 2e mois de vie larvaire.

6°) Le thymus est nécessaire au bon fonctionnement du complexe lympho-myéloïde. Son ablation entraîne l'inaptitude des têtards à synthétiser des anticorps et à résorber les homogreffes.

7°) Le fait que des têtards dont la rate contient moins de 10.000 cellules sont capables de produire des anticorps, l'étude des cellules productrices d'anticorps, l'analyse des courbes traduisant la réaction d'immunité acquise, nous fournissent des données indirectes pour discuter de l'origine des cellules productrices d'anticorps.

II. - LE PROBLEME DE L'ORIGINE DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS - HISTORIQUE.

C'est la spécificité des anticorps à l'égard des antigènes, découverte en 1890 par BEHRING et KITASATO qui est à l'origine du problème. En effet, cette spécificité est si marquée que le nombre de types d'anticorps doit être presque innombrable puisque le nombre des antigènes est lui-même immense.

Pour expliquer la possibilité de synthèse d'une telle multitude d'anticorps par les cellules, il fallait découvrir le mécanisme par lequel l'antigène provoque l'apparition et l'augmentation de la quantité de chaque type d'anticorps spécifique dans l'organisme.

En 1900, EHRLICH propose la théorie des récepteurs : l'organisme produirait des types cellulaires variés possédant à leur surface des récepteurs préformés capables de se combiner avec les antigènes. Selon cette théorie, la combinaison antigène-récepteur stimulerait la cellule. Celle-ci, activée, produirait en plus grande quantité le récepteur correspondant, détectable dans le sérum sous forme d'anticorps circulants. Cette théorie attribue donc un rôle passif à l'antigène, celui de sélectionner un récepteur spécifique préformé. C'est une théorie sélective; elle fut longtemps acceptée, tant que l'on considérait :

1) que le pouvoir antigénique était limité à des molécules existant dans la nature, donc en nombre élevé mais limité. A l'époque on pensait essentiellement aux toxines bactériennes et aux venins.

2) que les molécules d'anticorps dirigées contre un même antigène étaient identiques.

Or, en 1918, LANDSTEINER prouve d'une part que la spécificité du site actif d'une molécule d'anticorps est adaptée non à la totalité des molécules d'antigène, mais à certains petits groupements qu'elles renferment: les haptènes. D'autre part il montre que les animaux peuvent produire des anticorps spécifiques adaptés à n'importe quel haptène naturel ou synthétique, pourvu que ce dernier soit combiné à une protéine.

Après une telle découverte, il était difficile d'accepter encore la théorie sélective d'EHRLICH car, selon elle, il fallait supposer que l'organisme contenait des cellules possédant des récepteurs préformés, destinés

à réagir avec un nombre illimité d'haptènes, compte tenu des haptènes non naturels, ce qui paraissait invraisemblable.

Pour cette raison, BREINL et HAUROWITZ (1930) avancent les premiers l'idée que l'antigène administré peut interférer directement dans la cellule, avec le mécanisme de synthèse des anticorps et le modifier afin de lui faire synthétiser un anticorps complémentaire. Cette théorie instructive attribue donc un rôle actif à l'antigène dans l'induction de la réponse immunologique.

Depuis, les biochimistes ont découvert la nature et poussé loin l'étude de la structure exacte des molécules d'anticorps, ce qui modifie les données du problème. Les anticorps sont des γ globulines (TISELIUS, 1937) dont les molécules sont constituées de deux types de chaînes polypeptidiques, les chaînes lourdes et les chaînes légères (FLEISCHMAN et col., 1963 ; EDELMAN et col., 1964). La spécificité du site anticorps de la molécule est déterminée par la séquence de la centaine d'acides aminés situés sur l'extrémité à radical NH_2 de chaque chaîne (HILSCHMANN et col., 1965; TITANI et col., 1965). Ces régions de chaque chaîne lourde et légère sont donc variables dans leur composition en acides aminés et la spécificité d'une molécule d'anticorps pour un antigène est donc génétiquement déterminée (HABER, 1964).

Entre temps, on n'avait guère essayé de rajeunir les théories sur la production des anticorps en faisant le lien entre les récepteurs d' EHRLICH et la nature chimique des anticorps. Ce mérite revient à JERNE, en 1955. Dans sa théorie de la formation des anticorps, dite théorie de la sélection naturelle, il émet l'hypothèse que, chez l'individu neuf, les récepteurs des antigènes sont des anticorps préexistant à tout contact de l'individu avec un antigène (ces anticorps sont appelés "naturels").

BURNET en 1959 reprend cette idée dans sa théorie de la sélection clonale. Il pense que l'antigène stimule la multiplication des cellules qui synthétisent naturellement leur anticorps spécifique. Dans ce cas, selon lui, chaque cellule serait génétiquement prédéterminée à produire un type unique d'anticorps. Des divisions successives conduiraient à la constitution d'un clone de cellules productrices du même type d'anticorps.

Il faudrait alors prouver qu'une cellule n'est capable de produire qu'un seul type d'anticorps. C'est en effet assez bien établi à l'heure actuelle grâce aux travaux de GREEN, VASSALI, NUSSENWEIG et BENACERRAF (1967) et INGRAHAM et col. (1969) qui sont parmi les plus convaincants à ce sujet. Cependant, il faut bien faire remarquer que ces résultats ne prouvent rien au sujet de la potentialité des cellules. Ils prouvent seulement qu'à un moment donné, une cellule ne produit qu'un seul type d'anticorps.

Malgré ces preuves expérimentales partielles, la théorie de la sélection clonale soulève plusieurs objections.

1°) Peut-on concevoir dans un organisme la présence d'un nombre de cellules productrices d'anticorps naturels du même ordre que le nombre d'haptènes naturels ou synthétiques ?

L'existence de groupements antigéniques chimiquement apparentés sur certaines cellules ou molécules différentes provoque ce que l'on appelle des réactions croisées : un même anticorps réagit avec deux antigènes apparemment différents. Ceci permet de réduire le nombre des immunoglobulines nécessaires par rapport au nombre apparent des antigènes. En outre, les résultats de MAKELÄ (1965), confirmant ceux de LANDSTEINER (1946), montrent qu'une immunisation avec des bactériophages T_2 provoque chez la souris non seulement la formation d'anticorps $anti\ T_2$, mais aussi d'anticorps anti T_4 et T_6, ce qui prouve que la spécificité de l'anticorps n'a pas besoin d'être absolue pour qu'il y ait une réaction antigène - anticorps. Selon HAUROWITZ (1967) ces résultats permettraient de ramener à environ 10^6 ou 10^7 le nombre d'anticorps spécifiques nécessaires pour réagir avec tous les groupements antigéniques possibles.

2°) Cependant un fait nouveau apporte une objection supplémentaire à la théorie de BURNET : c'est l'hétérogénéité des immunoglobulines (sujet revu pour les immunoglobulines du lapin en 1968 par OUDIN). Cette hétérogénéité dans la structure primaire des chaînes polypeptidiques des molécules d'immunoglobulines est telle qu'il peut exister environ 50 ou 100 molécules différentes d'anticorps pour un seul déterminant antigénique (HAUROWITZ, 1967).

Pour concilier ce fait avec la théorie de la sélection clonale, il faudrait concevoir dans l'organisme un nombre de cellules prédéterminées 50 à 100 fois supérieur à celui des déterminants antigéniques.

Pour pallier cette objection BURNET avait déjà proposé en 1964 l'hypothèse que toutes les cellules souches des clones ne préexistent pas forcément, mais dérivent d'un nombre plus restreint de cellules, grâce à un processus d'hypermutabilité qui pourrait rendre compte de l'hétérogénéité des immunoglobulines.

Logiquement, cette hypermutabilité devrait se traduire par une instabilité de la structure des immunoglobulines chez un même animal au cours de sa vie. Or les travaux de MAGE chez le lapin (1967) montrent au contraire la stabilité des déterminants antigéniques des différents allotypes d'immunoglobulines, tout au long de la vie de l'animal (allotype = forme d'immunoglobuline définie par les groupements antigéniques ou spécificités antigéniques propres à l'individu et à l'espèce).

Toutes ces objections sont renforcées par l'existence de résultats expérimentaux qui, quoique peu nombreux, semblent incompatibles d'une part avec la théorie de la sélection clonale, d'autre part avec toute théorie sélective.

Ces travaux, en effet, tendent à montrer que les cellules lymphoïdes ne sont pas prédéterminées à réagir avec tel ou tel antigène et qu'en outre les cellules productrices d'anticorps ne dérivent pas forcément d'un précurseur par des divisions successives. Ils sont en accord avec d'autres

résultats qui semblent montrer que la stimulation antigénique n'est pas un phénomène passif comme cela est postulé dans les théories sélectives.

BUSSARD (1967) parvient à induire une réponse primaire in vitro en stimulant des cellules péritonéales de souris avec des globules rouges de mouton. Grâce à la technique des plages de lyse, il observe qu'en l'absence de divisions cellulaires, une cellule sur 1.000 environ est productrice d'anticorps anti hématies de mouton. Si ces cellules avaient été prédestinées à réagir contre un seul antigène, l'animal ne pourrait répondre qu'à environ un millier au plus d'antigènes ou de groupes d'antigènes semblables aux hématies de mouton, ce qui est trop peu pour rendre compte de l'ensemble des réponses d'immunité acquise de la souris.

On ne comprend pas comment ce résultat pourrait être compatible avec une théorie qui invoque l'existence de précurseurs génétiquement prédéterminés et unipotentiels.

L'injection de l'antigène à un animal est une technique qui complique l'étude de la stimulation antigénique au niveau cellulaire. SIMONSEN pratique l'inverse en injectant les cellules lymphoïdes actives chez un hôte qui fait office d'antigène (réaction du greffon contre l'hôte).

Chez le poulet, il injecte des lymphocytes à des embryons possédant des antigènes d'histocompatibilité différents de ceux du donneur. Il parvient ainsi à obtenir une réaction du greffon contre l'hôte (rendue visible par la splénomégalie due à la multiplication initiale des cellules stimulées du donneur) en injectant seulement 50 à 100 cellules. Cela signifierait, selon la théorie de la sélection clonale, que les cellules du donneur pourraient répondre seulement à 50 ou 100 antigènes différents, ce qui est un paradoxe évident.

Dans un autre ordre d'idées, FISHMAN et ADLER (1967) ont découvert que les macrophages transfèrent sous forme d'ARN une information concernant la structure des anticorps. Ils montrent aussi que l'ARN macrophagique d'un animal stimulé par un antigène, induit chez les cellules lymphoïdes d'un autre animal la formation d'anticorps ayant les caractéristiques propres à l'animal stimulé. Etant donné que la spécificité des macrophages pour les antigènes n'a jamais été prouvée, ces faits sont en faveur d'un rôle instructif de l'antigène dans la stimulation à sécréter l'anticorps correspondant.

Déjà en 1966, FORD, GOWANS et MAC CULLAGH avaient montré que les lymphocytes incubés in vitro avec des macrophages ayant phagocyté des globules rouges de mouton devenaient capables, sans contact direct avec cet antigène, de produire des anticorps anti globules rouges de mouton.

En résumé, selon ces auteurs, la stimulation antigénique ne serait pas due à une simple sélection, mais à un processus instructif, agissant sur des cellules multipotentes.

A la suite de ces résultats, des essais de conciliation ont été tentés. ASKONAS pense qu'après avoir ingéré l'antigène, les macrophages stimulent des cellules prédestinées à produire un seul type d'immunoglobuline (1968).

JERNE, tout récemment (1970), avance une théorie qui, quoique sélective, permet d'expliquer les résultats de SIMONSEN : il existerait dans l'organisme des cellules prédestinées à produire des anticorps (une cellule pour chaque anticorps) contre les antigènes d'histocompatibilité de l'espèce. Les cellules productrices d'anticorps, possédant elles-mêmes ces antigènes, se diviseraient, stimulées par la réaction antigène - anticorps se produisant à leur surface. Au cours des divisions qui s'ensuivent, des mutations interviendraient, provoquant la formation d'une grande diversité d'anticorps naturels. Cependant les cellules n'ayant pas subi de mutations, produisant toujours l'anticorps initial anti antigène d'histocompatibilité, finiraient par se "suicider". Les cellules qui fabriqueraient des anticorps contre les antigènes d'histocompatibilité n'existant pas chez l'individu, ne seraient pas détruites. Elles constitueraient ainsi une importante fraction de la population de lymphocytes, suffisamment importante pour expliquer, selon JERNE, les résultats de SIMONSEN.

Cependant, malgré ces tentatives de conciliation entre les faits et les théories, il est un point qui reste obscur, c'est la potentialité des cellules lymphoïdes. Sont-elles ou non prédéterminées à réagir avec un seul antigène et à ne synthétiser qu'un seul anticorps? C'est à cette fin précise que nous allons discuter nos résultats.

Dans une première partie, nous déterminerons le degré de spécificité des réactions d'immunité acquise chez le têtard, car cette notion conditionne la suite de la discussion. Il est évident en effet que si les réactions du têtard ne sont pas spécifiques, le problème ne se pose pas comme chez les Mammifères et la discussion perd de son intérêt.

Dans la deuxième partie, nous discuterons de la potentialité des cellules et de questions qui lui sont liées, par exemple l'existence de précurseurs et la nature du phénomène d'accroissement du nombre de cellules productrices d'anticorps après une immunisation.

III.- DEGRE DE LA SPECIFICITE DES REPONSES D'IMMUNITE ACQUISE CHEZ LE TETARD.

Essayons d'abord de la situer dans le règne animal, en la comparant aux résultats connus chez les Invertébrés et les Vertébrés supérieurs.

On peut considérer actuellement comme sûre l'existence de

réponses immunitaires acquises chez certains Invertébrés. On possède des données chez les Crustacés (CANTACUZENE, 1928; MAC KAY et col., 1969), les Siponcles (BANG, 1967), les Gorgones (THEODOR, 1966; SERRE et THEODOR, 1967) et surtout chez les Oligochètes (VALEMBOIS, 1962-1970; DUPRAT, 1964-1968; COOPER, 1968-1969), et chez les Insectes (sujet revu par CARTON, 1969). Il existe chez les animaux cités un mécanisme de reconnaissance des tissus autologues, mais sa manifestation dans les réactions immunitaires à l'égard des tissus ou cellules hétérologues peut revêtir deux formes différentes.

Il existe d'abord chez beaucoup d'Invertébrés une activité naturelle non spécifique à l'égard des tissus ou cellules provenant d'animaux phylogéniquement très éloignés. Il peut s'agir d'une activité agglutinante ou lysante à l'égard des cellules étrangères. Ce genre de facteur existe en abondance dans le liquide cœlomique d'Eisenia foetida (Oligochètes) (DU PASQUIER et DUPRAT, 1968).

Il existe aussi des réponses d'immunité spécifiquement acquise qui sont plus délicates à mettre en évidence. Jusqu'à présent en effet, une synthèse d'anticorps n'a pas pu être mise en évidence chez les Invertébrés malgré plusieurs travaux relatant l'augmentation de substances agglutinantes ou lysantes après des injections d'antigènes (BANG, 1967, chez le Siponcle, HINK et BRIGGS chez les Insectes, 1968-1970, MAC KAY chez l'Ecrevisse, 1969). En revanche, chez les Oligochètes, DUPRAT a démontré l'existence de réactions spécifiques d'immunité acquise dans le cas des homogreffes chez Eisenia foetida. Elle a montré qu'une 2e greffe de paroi du corps d'un même donneur sur un même hôte subissait spécifiquement un rejet accéléré pourvu que les vers aient une origine géographique différente. Ces résultats ont été confirmés par COOPER (1968-1969). VALEMBOIS (1962-1970) a démontré nettement, de son côté, l'existence d'une immunité acquise et spécifique dans le cas des hétérogreffes chez les Lombriciens.

Chez le têtard d'Alytes, comme chez les Vertébrés supérieurs, la finesse du mécanisme de reconnaissance est plus grande puisqu'elle se manifeste par une réaction de rejet des homogreffes indépendamment de l'origine géographique des individus. De plus, les têtards peuvent synthétiser des anticorps. En outre, le mécanisme de défense naturelle (innée) qui existe aussi chez le têtard sous forme, entre autres, d'un facteur cytolytique, exerce son action non seulement sur des cellules d'animaux phylogéniquement éloignés comme c'était le cas chez les Vers, mais aussi sur des cellules d'autres Anoures.

La spécificité des réactions d'immunité acquise chez le têtard est mise en évidence par les réactions de rejet spécifiquement accéléré des 2e homogreffes (HILDEMANN et HAAS chez le têtard de Rana catesbiana, 1959). Ces expériences semblent prouver, d'une part la spécificité de ce type de réponse immunitaire, d'autre part que les antigènes d'histocompatibilité ne sont pas strictement individuels, mais sont groupés de façon à former des

familles d'individus. Cette notion est d'ailleurs confirmée par la détection de différents allotypes des protéines sériques (COOPER et col., chez Rana catesbiana, 1964; DU PASQUIER chez Alytes obstetricans, 1964).

La réaction antigène-anticorps chez les Vertébrés inférieurs n'a pas toujours été considérée comme spécifique. SIROTININ (1960) met en évidence des réactions de précipitation non spécifique chez les Poissons : un immun sérum de poisson antilapin précipitait aussi bien les protéines du lapin que celles du cheval, antigènes qui habituellement ne provoquent pas de réactions croisées. Cependant AMBRCSIUS (1967), en comparant la synthèse des anticorps chez le silure, la tortue et le lapin, a pu montrer que le degré de spécificité des anticorps anti sérum albumine bovine était assez similaire chez ces trois espèces.

EVANS et col. (1966) ont montré de leur côté que les crapauds Bufo marinus pouvaient synthétiser des anticorps spécifiques contre la sérum albumine bovine, les antigènes H de Salmonella typhi, et les phages T_2.

Chez une tortue, Chelydra serpentina, SIDKY et AUERBACH (1968) ont mis en évidence in vitro la synthèse d'anticorps spécifiques contre les hématies de mouton et celles de souris.

Enfin HILDEMANN et THOENES (1969) ont pu détecter une réaction immunologique spécifique dans le cas des homogreffes chez un Vertébré très primitif, la myxine (Eptatretus stoutii). Chez le même animal ils ont pu induire la synthèse d'anticorps anti hématies de mouton.

Les résultats que nous avons obtenus avec les méthodes d'immunologie cellulaire ne nous ont pas montré de non-spécificité. Nous avons régulièrement constaté la spécificité des des anticorps synthétisés. Nous avons même été assez étonné de ne pas obtenir de réactions croisées lorsque nous avons utilisé des antigènes assez voisins l'un de l'autre comme les hématies de mouton et celles de l'homme.

Nous pensons ainsi pouvoir considérer comme spécifiques les anticorps synthétisés par les cellules lymphoïdes des Amphibiens, tout en sachant qu'une étude s'impose pour mesurer le degré d'affinité des anticorps pour les antigènes chez le têtard. Le problème de l'origine des cellules productrices d'anticorps se pose alors comme chez les Mammifères.

Examinons maintenant ce qu'apportent nos résultats au sujet de la potentialité des cellules produisant des anticorps spécifiques.

IV.- POTENTIALITE DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

A - LES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS DERIVENT-ELLES DE PRECURSEURS PREDETERMINES A SYNTHETISER UN SEUL TYPE D'ANTICORPS ?

L'un des postulats de la théorie de la sélection clonale est l'existence de précurseurs unipotentiels. Ceci revient à dire que les animaux sont capables de répondre à un nombre d'antigènes peut-être très grand mais limité.

Les expériences chez les Mammifères ont cherché à préciser ce nombre de précurseurs dans le cas de certains antigènes ou certaines mosaïques d'antigènes. C'est ainsi que PLAYFAIR et col. (1965), KENNEDY et col. (1966), PAPERMASTER (1967) injectent des hématies de mouton à des souris irradiées dont les lymphocytes sont détruits, puis recolonisées avec des lymphocytes provenant d'animaux normaux. En fonction du nombre de cellules lymphoïdes injectées et du nombre de foyers produisant des anticorps hémolytiques présents dans la rate des animaux colonisés, ils calculent le nombre de précurseurs à l'égard des antigènes érythrocytaires.

Ces auteurs pensent que le nombre de cellules stimulées par les antigènes des hématies sont au nombre de 1.000 à 5.000 dans la rate des souris, soit environ 1 cellule précurseur pour 10^5 cellules spléniques dans les rates contenant 2 x 10^8 lymphocytes.

Cependant, GERSHON et FELDMAN (1969) ont montré qu'il était impossible de faire confiance à cette technique pour estimer le nombre de précurseurs car, appliquant la même méthode, ils trouvent après injection d'hématies autant de foyers hémolytiques dans les tissus recolonisés que dans les tissus intercoloniaux.

BIOZZI et col. (1968), utilisant la méthode des rosettes, pensent que la probabilité de trouver une cellule sensible aux hématies de mouton chez la souris est d'environ 1/50.000. Ces conclusions sont fondées sur l'extrapolation au temps zéro des courbes d'augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps comptées avec la méthode des rosettes. On sait que cette méthode n'est pas absolument sûre, car il y a toujours une ambiguïté sur la nature des cellules formant des rosettes.

OSOBA avec une technique de culture de cellules conclut que le nombre de précurseurs stimulés par les hématies de mouton est d'environ 1 pour 3 x 10^6 cellules et 1,63 pour 10^6 cellules dans le cas des globules rouges de poulet. Son expérimentation, fondée sur l'estimation du nombre minimum de cellules au sein de laquelle il peut provoquer une stimulation in vitro, est sujette à caution car, pour des raisons techniques de culture, il mélange les cellules saines à des cellules irradiées qui ne sont pas forcément inactives.

L'ensemble des expériences est donc toujours techniquement plus ou moins critiquable. Considérons cependant les chiffres avancés par ces auteurs. Ils sont relativement compatibles avec une théorie sélective invoquant des précurseurs unipotentiels, dans la mesure où l'on admet de nombreuses réactions croisées et une spécificité assez faible des anticorps.

Chez nos animaux, dans l'hypothèse de précurseurs prédéterminés unipotentiels, on peut appliquer le principe d'OSOBA pour trouver le nombre de précurseurs. Dans nos expériences, la plus petite rate stimulable contenait environ 6.000 cellules, autrement dit, on peut considérer qu'il y avait dans cette rate au moins une cellule précurseur des cellules productrices d'anticorps anti hématies. Dans l'hypothèse de précurseurs prédéterminés, cela ramène à 6.000 environ le nombre d'antigènes auxquels l'animal pourrait répondre. Ce raisonnement n'est valable que dans la mesure où le rapport 1/6.000 n'est pas valable seulement pour la rate, mais pour l'ensemble des tissus producteurs d'anticorps. C'est effectivement ce que nous avons observé puisque nous avons détecté des cellules productrices dans pratiquement tous les organes lymphoïdes accessibles de l'animal, sauf le thymus.

En outre, en tenant compte du fait qu'on observe une splénomégalie après une stimulation antigénique, c'est en réalité une rate contenant moins de 6.000 cellules qui a été initialement stimulée. Dans ce cas, c'est donc à beaucoup moins de 6.000 antigènes que le têtard pourrait répondre selon une théorie de la sélection clonale. Ce nombre nous paraît trop faible pour être compatible avec la théorie de BURNET, étant donné le nombre de réponses que nous avons pu facilement détecter chez le têtard.

Il faut aussi tenir compte du fait que SURAN et PAPERMASTER (1967) ont montré que l'hétérogénéité des immunoglobulines était pratiquement aussi importante chez les Vertébrés inférieurs que chez les Mammifères, ce qui, selon l'hypothèse de cellules unipotentes, réduirait encore le nombre des antigènes auxquels le têtard pourrait répondre.

En fait, il semble bien que le nombre de cellules lymphoïdes que possède le têtard importe peu. En effet, des animaux mal thymectomisés, mais néanmoins amputés d'un très grand nombre de cellules lymphoïdes, comme l'ont montré les contrôles histologiques, ont donné des réponses immunitaires absolument normale. Par la même occasion, ceci montre que le thymus est plus un centre de différenciation ou de maturation des cellules qu'un organe où s'effectuerait la sélection des clones de cellules productrices comme cela avait été invoqué (BURNET, 1962).

En conclusion, il semble nécessaire d'abandonner l'hypothèse des précurseurs prédéterminés et unipotents. De quelle nature sont alors les précurseurs des cellules productrices d'anticorps ?

B - NATURE DES PRECURSEURS DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

Cette question invite à discuter de la nature des cellules formant naturellement des rosettes avec les érythrocytes (C.F.R. naturelles).

Certains de nos résultats ont montré que, pour chaque type d'érythrocyte utilisé, il existait un lien entre le taux de C.F.R. naturelles et l'intensité de la réponse immunitaire (cf Pl. 15). Cela signifie-t-il que les C.F.R. naturelles soient des précurseurs des cellules productrices d'anticorps ?

1°) Dans le cas de l'hypothèse de BURNET, cela semble impossible. Les précurseurs étant génétiquement prédéterminés, le nombre d'antigènes auquel le têtard pourrait répondre serait d'environ 2.000, en raison du nombre moyen de C.F.R. naturelles observées avec les hématies (10 à 100 pour 10^5 cellules spléniques). La possibilité d'un nombre aussi faible d'antigènes a été déjà écartée au paragraphe précédent.

2°) Si les C.F.R. naturelles sont les précurseurs, il faudrait que le nombre des cellules productrices soit toujours proportionnel au nombre de C.F.R. naturelles, or cela n'a pas été vérifié. En effet, lorsqu'au cours de l'ontogenèse, le taux de C.F.R. naturelles décroît, le taux de cellules productrices d'anticorps reste relativement constant chez les animaux immunisés. Cependant, la maturation des cellules peut entrer en ligne de compte. Il n'est pas impossible que les populations de cellules jeunes soient constituées de cellules incapables de produire des anticorps et cependant aptes à se combiner avec les antigènes. Dans ce cas, la planche 31 du chapitre V refléterait la maturation des cellules.

Le fait que pour chaque type d'antigène érythrocytaire étudié, l'intensité de la réponse dépende du taux de C.F.R. naturelles peut aussi être interprété plus simplement par l'existence d'un plus grand nombre de déterminants antigéniques actifs sur les hématies humaines que sur les hématies de mouton.

L'étude des cellules productrices d'anticorps hémolytiques naturelles (C.F.P. naturelles) ne nous renseigne guère. Il est clair que ces C.F.P. naturelles ne sont pas les précurseurs des C.F.P. comptées chez les animaux immunisés, puisque leur présence n'est pas nécessaire chez le têtard pour que l'on détecte une augmentation du nombre des C.F.P.

On ne peut donc pas savoir si les C.F.R. naturelles sont les précurseurs des cellules productrices d'anticorps.

C - NATURE DES CELLULES FORMANT NATURELLEMENT DES ROSETTES (C.F.R. NATURELLES).

Lors de leur étude, nous avons émis l'hypothèse qu'elles constituaient une population cellulaire hétérogène. Une telle hypothèse nous était suggérée par le pourcentage d'inhibition de la formation des rosettes obtenu avec un sérum anti-globulines et par l'existence de rosettes mixtes.

Certaines de ces cellules produisent sans doute naturellement des anticorps, d'autres adhèrent peut-être aux antigènes grâce à des anticorps cytophiles. Enfin, nous pensons qu'une dernière partie des cellules formant naturellement des rosettes réagit avec les antigènes par un processus non spécifique de l'antigène considéré, manifestant seulement l'existence d'un phénomène de reconnaissance des caractéristiques individuelles de l'animal.

THIERY (1968) par exemple a récemment suggéré qu'une couche de polysaccharides présente à la surface des lymphocytes pourrait intervenir dans les mécanismes d'adsorption des antigènes.

Notre hypothèse attribue donc à certaines C.F.R. naturelles la possibilité de réagir d'une manière non spécifique avec n'importe quel antigène. Il faudrait alors expliquer pourquoi toutes les cellules spléniques ne forment pas naturellement des rosettes avec les hématies que nous avons utilisées.

L'étude de la planche 31 permet d'interpréter ce fait : les C.F.R. naturelles constitueraient une population séparée de cellules spléniques totipotentes. Cette population, qui augmente en valeur absolue de 5 à 100 cellules lorsque la rate croît de 500 à 10^5 cellules, aurait un taux de croissance différent de celui des autres populations cellulaires de la rate. Dans ces conditions, la planche 31 représenterait l'allométrie de croissance de la population de C.F.R. naturelles.

L'étude biochimique approfondie du mécanisme de liaison entre les antigènes et les C.F.R. naturelles ne manquera pas d'intérêt et fera l'objet de prochains travaux.

En effet, dans l'état actuel de nos connaissances, nous ignorons si les sites récepteurs des molécules d'antigènes sont des immunoglobulines.. Chez les Mammifères, c'est une hypothèse souvent formulée; peut-on l'admettre chez le têtard ?

Dans une telle hypothèse on suppose que tous les animaux qui possèdent des C.F.R. naturelles sont capables de synthétiser des immunoglobulines. Selon la théorie de la sélection clonale il s'agirait même d'immunoglobulines spécifiques des antigènes.

Or nous avons constaté que, quel que soit le nombre de cellules lymphoïdes d'un têtard, il possédait toujours des C.F.R. naturelles. Récemment nous avons étudié des têtards de Rana dalmatina, beaucoup plus petits que ceux d'Alytes obstetricans. Au cours des premières semaines de leur vie,

ces larves sont encore incapables de donner des réponses d'immunité acquise, mais un certain nombre de leurs cellules lymphoïdes sont capables de former naturellement des rosettes avec diverses hématies. A cet âge les animaux pesaient entre 0,020 g et 0,040 g et leur rate contenait environ 1.500 à 2.500 cellules. Un calcul permet de se rendre compte que le nombre total de cellules lymphoïdes chez ces jeunes têtards ne peut excéder 8×10^4 cellules.

Compte tenu de la proportion de rosettes (70 ± 26 / 10^5 cellules spléniques), ces animaux pourraient synthétiser au maximum un lot de 1.500 Immunoglobulines à rôle de récepteur d'antigènes, ce qui nous paraît insuffisant pour confirmer l'hypothèse de la sélection clonale. Il faudrait plutôt imaginer l'existence d'immunoglobulines peu spécifiques à affinité plus ou moins grande pour les antigènes, ce qui leur permettrait de réagir avec un grand nombre d'antigènes.

On peut très bien objecter à notre critique que les C.F.R. naturelles chez les animaux immunologiquement immatures n'ont rien à voir avec les processus d'immunité acquise et que le mécanisme de leur action relève des défenses naturelles non spécifiques.

Il faut cependant rappeler qu'environ 75% des C.F.R. naturelles sont sous la dépendance du thymus, même chez les très jeunes animaux. On sait aussi qu'il existe chez le têtard un lien entre le taux de C.F.R. naturelles et la réponse immunologique. Il semble donc qu'une partie au moins des C.F.R. naturelles participe aux réactions de type immunologique.

En résumé, bien que n'ayant pas pu déterminer avec précision le rôle des C.F.R. naturelles, les résultats numériques obtenus sont incompatibles, surtout en ce qui concerne les petites rates, avec l'hypothèse de cellules prédéterminées à réagir avec un seul antigène. Cette conclusion s'ajoute à celle du paragraphe A montrant que les petites rates sont stimulables, et tend à prouver la multipotentialité des cellules.

Une telle conception nous oblige à rendre compte de l'aspect quantitatif et dynamique de l'augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps.

D - AUGMENTATION DU NOMBRE DES CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS.

Chez les Amphibiens comme chez les Vertébrés supérieurs la stimulation antigénique provoque d'une part une multiplication cellulaire dans les organes stimulés, d'autre part une augmentation relative, d'allure généralement exponentielle, du nombre de cellules productrices d'anticorps spécifiques. Or, le nombre de cellules productrices est loin d'être égal au nombre total de cellules nouvelles apparues dans l'organe stimulé. Ce phénomène se traduit au cours de l'immunisation par l'apparition d'une grande

quantité d'Immunoglobulines n'ayant pas la fonction d'anticorps spécifiques (HUMPHREY, 1963; CORVAZIER, CHRISTOL, 1968) (1).

La théorie de la sélection clonale permet d'expliquer facilement l'augmentation exponentielle des cellules productrices à partir d'un précurseur dont la descendance fabriquerait le même anticorps. Ce point a d'ailleurs été prouvé par des expériences de détection des cellules incorporant la thymidine tritiée (DUTTON et MITSCHELL, 1967). Cependant on peut concevoir une augmentation d'allure exponentielle sans invoquer des divisions cellulaires. BUSSARD (1967) en stimulant des cellules péritonéales in vitro observe un nombre de cellules productrices du même ordre que celui que l'on obtient chez une souris normalement immunisée, et cela sans divisions cellulaires.

Il pourrait exister un mode de stimulation en chaîne grâce à des interactions cellulaires. Ces interactions ont d'ailleurs été observées et filmées en culture de cellules (BUSSARD, 1967) ou d'omentum de souris (FISCHER, 1967). Chez le têtard, nous avons été frappé de voir augmenter le nombre des éosinophiles après une stimulation antigénique et de les observer dans les organes d'où ils sont généralement absents comme le thymus (Pl. 30, fig. 3). Ils pourraient jouer un rôle d'intermédiaire dans la réaction comme l'avait suggéré SPEIRS (1960).

A propos des expériences de BUSSARD, nous voudrions rappeler que les cellules péritonéales peuvent être considérées comme primitives. Nos observations de leur recrutement après immunisation, à partir d'un tissu hématopoïétique très primitif comme la couche sous-capsulaire du foie, le prouvent. De ce fait il n'est pas impossible que les cellules péritonéales aient un comportement et des potentialités différentes de celles des lymphocytes ordinaires.

Le processus d'augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps n'est donc pas nécessairement la division cellulaire seule. Chez nos animaux, la détection de 1 cellule productrice d'anticorps hémolytique dans une rate de 6.000 cellules est difficilement explicable par les divisions cellulaires. L'observation d'un très petit nombre de cellules productrices après 5 jours de stimulation sera toujours mal conciliable avec l'hypothèse d'une succession de divisions cellulaires. Or, c'est généralement le type de réponse que nous observons chez le têtard où le nombre de cellules productrices d'anticorps hémolytiques excède rarement 3 ou 4 dans les rates de 30.000 cellules par exemple.

Il reste à expliquer ce que sont les cellules non productrices d'anticorps apparues après les divisions cellulaires qui suivent une immunisation.

---

(1) - Note : Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation de β et γ globulines que nous avons observée après une greffe (Chapitre IV).

Les théories sélectives rendent mal compte de leur existence. L'hypothèse de la multipotentialité des cellules permet de mieux l'expliquer.

Nous proposons donc l'hypothèse suivante :

1°) Les divisions cellulaires suivant l'introduction d'un antigène ne seraient pas provoquées spécifiquement par cet antigène . Tout antigène aurait la propriété de provoquer des divisions cellulaires.

2°) Les cellules issues des divisions seraient indifférenciées et susceptibles d'être induites à former un anticorps sous l'action de l'antigène. Cette différenciation ne serait pas forcément définitive. En effet, nous avons été frappé par la chute très brutale du nombre de cellules formatrices d'anticorps après le maximum de la réaction. Cette chute ne nous paraît pas explicable par la mort brutale des cellules, mais plutôt par un arrêt de production des anticorps. Les cellules seraient alors susceptibles de réagir éventuellement avec un nouvel antigène.

En résumé, nous nous éloignons de plus en plus des hypothèses sélectives et de la théorie de la sélection clonale en pensant :

1°) que les cellules lymphoïdes sont multipotentes,

2°) que l'augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps n'est pas forcément due à la division de cellules précurseurs.

Cette discussion nous a amené à prendre des positions excluant, à première vue, l'éventualité de processus sélectifs. Dans plusieurs cas, ces incompatibilités ne sont qu'apparentes. En effet, plusieurs tentatives de conciliation entre théories sélective et instructive ont été faites. HUMPHREY et col. (1964) suggèrent qu'au début de la vie les cellules seraient multipotentielles. Puis des contacts successifs avec les antigènes provoqueraient la dérépression de la synthèse des anticorps correspondants et la constitution d'une population de cellules productrices activables alors par un processus sélectif. BOYDEN (1963) émet l'hypothèse que les nouveaux-nés possèdent un échantillonnage très réduit d'anticorps naturels. Les mosaïques d'antigènes possédant un groupement capable de se combiner avec eux seraient captées par les cellules. Ces cellules pourraient alors fabriquer des anticorps contre cet antigène et fournir en outre une descendance apte à réagir contre tous les autres groupements antigéniques de la molécule complexe initiale.

Ces hypothèses éliminent néanmoins l'idée de la multipotentialité permanente des cellules. Une telle restriction nous semble inutile. Que le processus de stimulation antigénique soit sélectif ou instructif, les cellules peuvent très bien être multipotentes. En particulier, il ne semble pas absolument nécessaire de faire appel à de véritables mutations somatiques pour obtenir une synthèse d'immunoglobulines différentes. Il existe des exemples dans la nature de cellules possédant tous les gènes nécessaires à la constitution d'un individu et qui n'en expriment normalement qu'un nombre

limité. C'est ce que montrent les travaux de HADORN et de son équipe(1965) chez Drosophila. HADORN, en cultivant les cellules de disques imaginaux, parvient à montrer que ces cellules définitivement déterminées en apparence à former un type de structure imaginale,possèdent encore en fait tous les gènes nécessaires à la constitution de tous les organes de l'individu puisqu' elles peuvent expérimentalement en manifester les effets. Ces potentialités nouvelles s'expriment à la suite d'un grand nombre de divisions au sein de la population des cellules provenant des disques imaginaux. La stabilité de la détermination des cellules n'est donc pas irrévocable.

Chez les animaux doués d'un grand pouvoir de régénération, en particulier chez les Amphibiens, il est possible de voir des cellules différenciées d'un tissu se dédifférencier puis participer à la régénération d'un autre organe ou tissu. L'exemple le plus classique se trouve dans la régénération dite wolfienne du cristallin chez les Urodèles. Le nouveau cristallin est formé par l'iris resté en place, c'est-à-dire par une partie de l'ancienne capsule rétinienne, tandis que chez l'embryon le cristallin provient de l'épiblaste. Un autre exemple est fourni par les expériences de DAVIS et col. (1966) chez Hydra viridis : des cultures de gastroderme d'Hydra viridis ont permis d'observer la transformation directe de cellules digestives en cellules épidermiques. De même, des cellules de glande digestive peuvent se dédifférencier, puis se multiplier et donner des cnidoblastes.

Ces comparaisons semblent avoir peu de rapports avec la synthèse des anticorps. Elles nous semblent cependant pertinentes dans la mesure où, dans les exemples choisis, on assiste à une différenciation cellulaire. En outre, l'existence générale, surtout chez les animaux inférieurs, de cellules multipotentes ou totipotentes permet de répondre partiellement à certaines objections de JERNE à l'existence de lymphocytes pluripotentiels. JERNE (1967) estime impossible que les initiales des cellules productrices d'anticorps possèdent un lot de répresseurs aussi nombreux que le nombre de gènes codant pour la structure des diverses immunoglobulines. Mais les travaux récents d'embryologie expérimentale rendent de plus en plus probable que la plupart des cellules somatiques, sinon toutes, peuvent au moyen d'artifices convenables redevenir totipotentes et donner ensuite n'importe quelle catégorie cellulaire. La détermination et la spécialisation cellulaire qui s'ensuit sont le témoignage qu'il existe dans toute cellule différenciée et fonctionnelle un nombre considérable de répresseurs, ou, si les répresseurs sont chimiquement moins nombreux, qu'ils sont répartis sur les divers sites des chaînes d'ADN des chromosomes avec une variété presque innombrable.

D'une manière générale, les tendances actuelles de l'embryologie sont peu favorables à la conception qu'une catégorie cellulaire, surtout aussi polymorphe que les cellules immunologiquement actives, acquière très tôt une spécialisation génétique extrême et irréversible.

Cette discussion très partielle ne tient pas compte de plusieurs points qui devraient être pris en considération et que nous n'avons encore que partiellement étudiés chez le têtard : la réponse secondaire, la tolérance immunologique et l'auto-immunité.

Nous espérons néanmoins que ce travail apporte un argument en faveur de la multipotentialité des cellules lymphoïdes chez les Vertébrés.

CONCLUSION

L'ensemble des expériences rapportées montre qu'une larve d'Amphibien peut présenter des réactions d'immunité acquise voisines de celles des Vertébrés supérieurs. Cela peut paraître surprenant si l'on songe au caractère larvaire et primitif de son complexe lymphoïde qui la fait comparer plus à un fœtus de Mammifère qu'à un adulte. Cependant, l'existence de stimuli antigéniques qui assaillent la larve dès son éclosion peut expliquer l'activation précoce des cellules du complexe lympho-myéloïde.

Capables de synthétiser des anticorps apparemment spécifiques, ces animaux constituent par leur simplicité et leur petit nombre de cellules un matériel de choix pour l'étude des cellules productrices d'anticorps et de leur origine.

Les résultats quantitatifs de l'analyse de la production des anticorps sont incompatibles avec les théories invoquant l'existence de cellules unipotentes prédéterminées à réagir avec un seul antigène. Pour expliquer les résultats obtenus, il faut émettre l'hypothèse que les cellules lymphoïdes du têtard sont multipotentes, sinon totipotentes.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE SOMMAIRE

ADA G.L., PARISH C.R., NOSSAL G.J.V., ABBOT A., 1967 - The tissue localization, immunogenic and tolerance inducing properties of antigen fragments.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 32, Antibodies, 381-393.

ALLEN F.W., MAC DANIEL E.C., 1937 - A study of the relation of temperature to antibody formation in cold blooded animals.
J. Immunol., 32, 142-152.

AMBROSIUS H., 1967 - Untersuchungen über die Immunoglobuline niederer Wirbeltiere.
Allerg. Asth., 13, 111-119.

ANDERSON R.L., 1932 - Skin graft as indicators of interspecific relationship in Triturus.
Anat. Rec., 54, 60 (supplément).

ARONSSON T., GRONWALL A., 1957 - Improved separation of serum protein in paper electrophoresis. A new electrophoretic buffer.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 9, 338-341.

ASKONAS B.A., AUZINS I., UNANUE E.R., 1968 - Rôle of macrophages in immune response.
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1113-1128.

AUERBACH R., RUBEN L.N., 1970 - Studies of antibody formation in Xenopus laevis .
Received for publication.

BACULI B.S., COOPER E.L., 1968 - Lymphomyeloid organs in Amphibia. IV. Normal histology in larval and adult Rana catesbiana.
J. Morph., 126, 463-476.

BANG F.B., 1967 - Serological response among invertebrates other than insects.
Feder. Proc., 26, 1680-1684.

BAZIN H., DUPLAN J.F., 1967 - Modification du taux d'immunoglobulines chez des souris thymectomisées à l'âge adulte et irradiées.
Rev. franç. ét. clin. biol., 11, 987-1.000.

BEHRING E., KITASATO S., 1890 - Uber das Zustandekommen der Diphterie-Immunität und des Tetanus-Immunität bei Thieren.
Deutsche Med. Wochenschr., 16, 1113.

BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D, LIACOPOULOS-BRIOT M., DECREUSEFOND C., BOUTHILLIER Y., 1966 - Etude du phénomène de l'immuno-cyto-adhérence au cours de l'immunisation.
Ann. Inst. Pasteur, 110. Supplément n° 3, 7 - 32.

BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D., LIACOPOULOS-BRIOT M., DECREUSEFOND C., BOUTHILLIER Y., 1967 - Etude des cellules productrices d'anticorps par la méthode de l'immuno-cyto-adhérence.
Path. Biol., 15, 402-409.

BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D., BOUTHILLIER Y., DECREUSE-FOND C., 1968 - A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes.
Immunology, 14, 7.

BISSET K.A., 1947 - The effet of temperature on immunity in Amphibia.
J. Path. Biol., 59, 301-306.

BISSET K.A., 1947 - Natural and acquired immunity in frog and fishes.
J. Pathol. Bacteriol. G.B., 59, 679-682.

BIZERTE G., PAYSANT P., HAVEZ R., RACADOT A., 1960 - Intérêt du tampon Tris - E.D.T.A. borate pour l'électrophorèse sur papier des sérums normaux et pathologiques.
Ann. Biol. Clin., 18, 603-616.

BCRAKER D.K., HILDEMANN W.H., 1965 - Maturation of alloimmune responsiveness in mice.
Transplantation, 3, 202-223.

BORN G., 1897 - Union of amphibia larvae.
Arch. f. Entwicklungmek., 4, 349 et 517.

BOYDEN S.V., SORKIN E., 1960 - The adsorption of antibody and antigen by spleen cells in vitro.
Immunology, 3, 272-283.

BOVBJERG A.M., 1966 - Rejection of skin homografts in larvae of Rana pipiens.
J. Exp. Zool., 161, 69-80.

BOYDEN S.V., 1963 - Cytophilic antibodies.
in Cell bound antibodies. Wistar Institute Press, 7-17.

BOYDEN S.V., 1966 - Natural antibodies and the immune response.
Adv. Immunol., 5, 1-24.

BREINL F., HAUROWITZ F., 1930 - Chemishe Untersuchungen des Praezipitates aus Haemoglobin und Antihaemoglobin Serum und Bemerkungen uber die Natur der Antikörper.
Zs. Physiol. Chem., 192, 45 (cité par Haurowitz, 1967).

BURNET F.M., 1959 - The clonal selection theory of acquired immunity.
209 p., Vanderbilt Univ. Press, Nashille, U.S.A.

BURNET F.M., 1961 - Immunological recognition of self.
Science, 133, 307-311.

BURNET F.M., 1962 - Role of the thymus and related organs in Immunity.
Brit. Med. J., 2, 807.

BURNET F.M., 1962 - Evolution of the immune process in Vertebrates.
Nature, 218, 426-430.

BURNET F.M., 1964 - A Darwinian approach to immunity.
Nature, 203, 451-454.

BUSSARD A., 1964 - L'adsorption des anticorps sur des cellules ganglionnaires normales, employées comme méthode sensible pour déceler ces anticorps.
C.R. Acad. Sci., Paris, 259, 3411-3413.

BUSSARD A., HANOUN C., 1965 - Examen des immunocytes en culture in vitro : individualisation fonctionnelle et identification morphologique.
C.R. Acad. Sci. Paris, 260, 6486-6489.

BUSSARD A., 1967 - Primary antibody response induced in vitro among cells from normal animal.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, Antibodies.

BUSSARD A., 1967 - Présentation de film à l'E.M.B.O. course.
Nov. 1967, Francfort.

BUTLER L.C., REES T.A., ELEK S.D., 1962 - Studies on the serum proteins of Xenopus laevis (Daudin).
Comp. Biochem. Physiol., 6, 105-110.

CAMBAR R., MARTIN S., 1960 - Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du crapaud accoucheur Alytes obstetricans.
Act. Soc. Linn. Bordeaux, 98, 3-32.

CAMPBELL D.H., GARVEY J.S., CREMER N.E., SUSSDORF D.H., 1964 - Methods in immunology, 263 p., Benjamin, New-York.

CANTACUZENE J., 1928 - Recherche sur les réactions d'immunité chez les Invertébrés.
Arch. Roum. Path. Expr., 1, 7-80.

CARTON Y., 1969 - Données récentes sur les phénomènes d'immunité humorale acquise chez les Invertébrés.
Ann. Biol., 8, 657-682.

CASPANI R., MAGISTRETTI M., 1954 - Plasma, 2-1-54.
Cité par Lewin J. et Hillion P.

CAVALLO G., IMPERATO S., 1967 - Caratterische di specie e di individuo nella produzione di sostanze naturali di defesa.
Giorn. Mal. Inf. Paras., 2, 1-20.

CHALUMEAU-LE FOULGOC M.T., FINE J.M., GALLIEN L., 1966 - Etude analytique et nomenclature des protéines sériques de l'amphibien Urodèle Pleurodeles Waltlii (Michah.).
C.R. Acad. Sci. Paris, 262, 1989-1994.

CHARLEMAGNE J., HOUILLON C., 1968 - Effets de la thymectomie larvaire chez l'Amphibien Urodèle Pleurodeles Watlii (Michah.). Production à l'état adulte d'une tolérance aux homogreffes cutanées.
C.R. Acad. Sci. Paris, 267, 253-256.

CHARLEMAGNE J., 1967 - Etude des protéines sériques de l'Amphibien Urodèle Triturus alpestris (Laur.) chez l'adulte au cours de la métamorphose.
Bull. Soc. Zool. France, 92, 153-160.

CHARLEMAGNE J., 1967 - Etude par électrophorèse et immuno-électrophorèse des protéines sériques de l'Axolotl Ambystoma mexicanum (Schow).
Bull. Soc. Zool. France, 92, 739-748.

CHIAKULAS J.J., SCHEVING L.E., 1964 - Mitotic activity in the hemopoietic cortical zone of the liver of urodele larvae.
J. Morph., 114, 361-369.

CHILLER J.M., HODGINS H.O., CHAMBERS V.C., WEISER R.S., 1969 - Antibody response in Rainbow trout (Salmo gairdneri).
I - Immunocompetent cells in the spleen and anterior kidney.
J. Immunol., 102, 1193-1201.

II - Studies on the kinetics of development of antibody producing cells and on complement and natural hemolysis.
J. Immunol., 102, 1202-1207.

COHEN N.J., 1966 - I. Tissue transplantation immunity in the adult Newt Diemictylus viridescens.
J. Exp. Zool., 163, 157-172.

II. Ibid. 173-189.

III. Ibid. 231-239.

COHEN N.J., 1968 - Chronic skin allograft rejection in the Urodela.
J. Exp. Zool., 167, 37-47.

COHEN N.J., HILDEMANN W.H., 1968 - Population studies of allograft rejections in the Newt Diemictylus viridescens.
Transplantation, 6, 208-217.

COHEN N.J., 1970 - In Phylogeny of Transplantation immunity.
Los Angeles, January 1970, in press.

COLE W.H., 1922 - Transplantation of skin in frog tadpoles.
J. Exp. Zool., 35, 353.

COLLINS H.H., ADOLPH E.F., 1926 - Skin pattern in urodele amphibian.
J. Morphol., 42, 473.

COONS A.H., 1951 - Fluorescent antibodies as histochemical tools.
Fed. Proc. 10, 558-559.

Pour la bibliographie de COONS, voir NAIRN (16 références).

COOPER E.L., HILDEMANN W.H., PINKERTON W., 1963.- Serum antibody synthesis and skin homograft survival in larvae of the bullfrog Rana catesbiana : Rôle of the thymus gland.
Immunogenet. Lett., 3, 62-67.

COOPER E.L., HILDEMANN W.H., PI NKERTON W., 1964 - Serum antibody synthesis in larvae of the bullfrog Rana catesbiana.
Biol. Bull., 127, 232-237.

COOPER E.L., HILDEMANN W.H., 1965 - a) The immune response of larval bullfrog Rana catesbiana to diverse antigens.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 126, 647-651.

COOPER E.L., HILDEMANN W.H., 1965 - b) Allograft reactions in bullfrog larvae in relation to thymectomy.
Transplantation U.S.A., 3, 446-448.

COOPER E.L., 1967 - a) Some aspects of histogenesis of the amphibian lymphomyeloid system and its rôle in immunity.
In Ontogeny of immunity. R.T. Smith, R.A. Good, P.A. Miescher, eds., 87-101, Univ. Florida Press, Gainesville.

COOPER E.L., 1967 - b) Lymphomyeloid organs of Amphibia. I - Appearance during larval and adult stages of Rana catesbiana.
J. Morph., 122, 381-390.

COOPER E.L., HERRERA F.G., 1968 - Chronic skin allograft rejection in the apodan Typhlonectes compressicauda.
Copeia, 2, 224-229.

COOPER E.L., 1968 - Lymphomyeloid organs of Amphibia. III - Antibody synthesis and lymph glands in larval bullfrog.
Anat. Rec., 162, 453-458.

COOPER E.L., 1969 - Chronic allograft rejection in Lumbricus terrestris.
J. Exp. Zool., 171, 69-74.

CORVAZIER P., CHRISTOL G., 1968 - Proportions relatives des globulines non agglutinantes et des agglutinines formées in vitro au cours des réactions immunitaires classiques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1149-1158.

COTRONEI G., 1952 - Risultati sperimentali e problemi sui trapienti espianti parabiosi xenoplastische negli amphibi.
Atti. Acad. nazion. Lincei Rendic. il Sci. per. Mat. nat., 13, 223-229.

COWDEN R.R., DYER R.F., GEBHARDT B.M., VOLPE E.P., 1968 - Amphibian plasma cells.
J. Immunol., U.S.A., 100, 1293-1295.

CUNNINGHAM A.J., 1965 - A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells.
Nature, London, 207, 1106-1107.

CUSHING J.E., 1967 - Invertebrates, immunology and evolution. Feder. Proc., 26, 1666-1670.

DAVIS L.E., BURNETT A.L., HAYNES J.F., MUNAW V.R., 1966 - A histological and ultrastructural study of dedifferentiation and redifferentiation of digestive and gland cells in Hydra viridis. Develop. Biol., 14, 307-329.

DELANNEY L.E., 1961 - Homografting of sexual mature Mexican Axolotl. Amer. Zool., 1, 349.

DENUCE J.M., 1966 - Immunosystematick en Vergelijkende immunologie. Biologish Jaarboek., 162-180.

DEUTSCH H.F., MORTON J.I., 1957 - Cité par Kabat et Mayer (Experimental Immunochemistry, p.351). Science, 125, 600.

DIENER E., NOSSAL G.J.V., 1966 - Localization of antigens and immune response in the toad Bufo marinus. Immunology, 10, 535-542.

DIUNOGORSKAJA N.N., 1957 - Influence des conditions du milieu extérieur sur le succès de la transplantation du coeur de grenouille (en russe). Fiziol. Zh. SSSR , 43, 550-560.

DRESSER D.W., WORTIS H.H., 1965 - Use of an antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency. Nature, 208, 859.

DUFAU-CASANABE J., 1961 - Contribution à l'étude du facteur rhumatoïde par les réactions au latex. Thèse Doct. Med. 139 p. Imprimerie du Sud-Ouest, Toulon.

DU PASQUIER L., 1965 - Recherches sur les aspects cellulaires et humoraux de l'intolérance aux homogreffes chez le têtard d'Alytes obstetricans. Thèse de 3ème Cycle, Fac. Sci., Bordeaux.

DU PASQUIER L., 1965 - Aspects cellulaires et humoraux de l'intolérance aux homogreffes de tissu musculaire chez le têtard d'Alytes obstetricans.
C.R. Acad. Sci. Paris, 261, 1144-1147.

DU PASQUIER L., 1967 - Les réactions immunitaires chez le têtard d'Alytes obstetricans. I. Technique d'immunisation et répartition de l'antigène.
C. R. Soc. Biol., 161, 1696-1699.

DU PASQUIER L., 1967 - Ibid. II. Caractérisation des immunocytes.
C.R. Soc. Biol., 161, 1974-1977.

DU PASQUIER L., DUPRAT P., 1968 - Aspects humoraux et cellulaires d'une immunité naturelle non spécifique chez l'Oligochète Eisenia foetida (Sav.) (Lumbricinae).
C.R. Acad. Sci. Paris, 266, 538-541.

DU PASQUIER L., 1968 - Les protéines sériques et le complexe lympho-myéloïde chez le têtard d'Alytes obstetricans normal et thymectomisé.
Ann. Inst. Pasteur, 114, 490-502.

DU PASQUIER L., 1969 - Aspects cellulaires et humoraux de la synthèse d'anticorps hémolytiques chez la larve et l'adulte d'Amphibiens anoures.
C.R. Soc. Biol., 163, 1379-1382.

DU PASQUIER L., 1970 - Ontogeny of the immune response in animals having less than one million lymphocytes : the larvae of toad Alytes obstetricans.
Immunology, 19, n° 2, sous presse.

DUPUY G., 1964 - Les autogreffes, les homogreffes et les hétérogreffes de peau chez les têtards de Discoglossus pictus et Alytes obstetricans.
Thèse Doctorat en Biologie animale, Bordeaux.

DUPRAT P., 1964 - Mise en évidence de réactions immunitaires dans les homogreffes de paroi du corps chez le Lombricien Eisenia foetida typica.
C.R. Acad. Sci. Paris, 259, 4177-4180.

DUPRAT P. , 1967 - Etude de la prise et du maintien d'un greffon de paroi du corps chez le Lombricien Eisenia fœtida typica.
Ann. Inst. Pasteur, 113, 867-881.

DUPRAT P., 1968 - Etude des autogreffes et des homogreffes de paroi du corps chez le Lombricien Eisenia fœtida (Sav.). Aspects histologiques et immunitaires de la prise et de l'acceptation ou du refus des greffons.
Thèse Doctorat ès Sciences, B ordeaux.

DURANTE M., 1953 - Comportamento degli abbozzi della branche e dell'otocisti nei trapienti xenoplastici di amphibi.
Riv. Biol. Ital., 45, pp. 279-312.

DUTTON R.W., MISHELL R.I., 1967 - Cellular events in the immune response. The in vitro response of normal spleen cells to erythrocyte antigens.
Cold Spring Harbour Symposia on quantitative biology, 32, 407-414.

EAKIN R.M., HARRIS M., 1945 - Imcompatibility between amphibian host and xenoplastic grafts as related to host age.
J. Exp. Zool., 98, 35-64.

EDELMAN G.M., GALLY J.A., 1964 - A model for the 7 S antibody molecule.
Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 846.

EHRLICH P., 1900 - On immunity with special reference to cell life.
Proc. Royal Soc., B., 66, 424-448.

ERDMANN R., 1927 - Relationship of Anuran families tested by means of implantation experiments of skin grown in tissue culture.
Arch. f. Entwicklungmech., 112, 739. Cité par Loeb.

ERICKSON P., 1962 - Reactions to homografts in Triturus viridescens.
Transplant. Bull. U.S.A., 1, 137-141.

ERNST P., 1890 -
Beitr. Path. Anat., 8, 203. Cité par Bisset.

EVANS E.E., HORTON S. L., 1961 - Synthesis and electrophoretic distribution of antibodies in the amphibian Bufo marinus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107, 71-74.

EVANS E.E., 1963 - Antibody response in Amphibia and Reptilia.
Feder. Proc., 22, 1131-1137.

EVANS E.E., KENT S.P., ATTLEBERGER M.H., 1964 - Lymphnodes in the Amphibia Bufo marinus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 116, 456-459.

EVANS E.E., KENT S.P., BRYANT R.E., MOYER M., 1966 - Antibody formation and immunological memory in the marine toad.
Phylogeny of immunity. R.T. Smith, P.A. Miescher, R.A. Good eds., Univ. Florida Press,, Gainsville, 218-226.

FICHTELIUS K.E., 1960 - On the destination of thymus lymphocytes.
Ciba found. Haemopoiesis, 204-236.

FISCHER H., AX W., MALCHOW H., 1968 - Mise en évidence de la participation des cellules mésothéliales à la stimulation primaire et secondaire par des antigènes in vitro.
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1159-1168.

FISHMAN M., ADLER F.L., 1967 - The role of macrophage-RNA in the immune response.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology. Antibodies, 32, 343-348.

FLEISCHMAN J.B., PORTER R.R., PRESS E.M., 1963 - The arrangement of the peptide chains in γ globulins.
Biochem. J., 88, 220.

FORD W.L., GOWANS J.L., MAC CULLAGH P., 1966 - The origin and function of lymphocytes.
Ciba found. Symposium. The thymus. G.E.W. Wolstenholme, R. Porter eds., 58-85.

FREUND J., 1930 - Influence of age upon antibody formation.
J. Immunol., 18, 315-324.

FRIEDEN E., HERNER A.E., DISCH L., LEWIS E.J.C., 1957 - Changes in serum proteins in amphibian metamorphosis.
Science U.S.A., 126, 559-560.

FRIEDMAN H., 1965 - Absence of antibody plaque forming cells in spleens of mice thymectomized, immunized with sheep erythrocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118, 1176-1180.

GARVEY J.S., CAMPBELL D.H., 1966 - Autoradiographic investigation of tissues after primary and multiple antigenic stimulation of rabbits.
Nature (London), 209, 1201-1202.

GASSER F., 1964 - Modification des protéines sériques consécutive à la métamorphose chez les Amphibiens urodèles Pleurodeles waltlii et Salamandra salamandra. Etude par électrophorèse sur acétate de cellulose.
C.R. Acad. Sci. Paris, 259, 655-657.

GASSER F., DURAND J., 1965. - Etude du sérum chez les Urodèles Proteus anguinus et Ambystoma mexicanum. Fractionnement par électrophorèse et relargage.
C.R. Acad. Sci. Paris 261, 2767-2770.

GASSUL R., 1923 - Homotransplantation of explanted adult frog skin.
Arch. f. Entwicklungsmech., 52, 400.

GERSHON H., FELDMAN M., 1969 - The immune reactivity of lymph-node-derived spleen colonies and intercolonial cells.
Immunology, 16, 175-185.

GEWURZ H., FINSTAD J., MUSCHEL L.H., GOOD R.A., 1966 - Phylogenic inquiry into the origin of the complement system.
In Phylogeny of Immunity. R.T. Smith, P. Miescher, R.A. Good eds. Univ. of Florida Press, Gainsville, 105-117.

GONZALES-GUZMAN I., 1960 - Some experimental data that show the presence of antibody in histiocytes.
In Reticulo endothelial structure and function. J.H. Heller ed., Ronald-Press, 39-43.

GOOD R.A., PAPERMASTER B.W., 1964 - Ontogeny and Phylogeny of adaptive immunity.
Adv. in Immunol., 4, 1-115.

GOOD R.A., FINSTAD J., POLLARA B., GABRIELSEN A.E., 1966 - Morphologic studies on the evolution of the lymphoid tissues among the lower vertebrates.
In Phylogeny of Immunity, 149-170.

GRABAR P., BURTIN P., 1964 - Immuno-electrophoretic analysis.
Elsevier.

GREEN I., VASSALI P., NUSSENSWEIG V., BENACERRAF B., 1967 - Specificity of the antibodies produced by single cells following immunization with antigens bearing two types of antigenic determinants.
J. Exp. Med., 125, 511.

HABER E., 1964 - Recovery of antigenic specificity after denaturation and complete reduction of disulfides in a papain fragment of antibody.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 52, 1099-1106.

HADORN E., 1945 - Entwicklungsleistungen und Unverträglichbeitsreaktionen bei Art-Chimären von Triturus .
Rev. Suisse Zool., 52, 389-395.

HADORN E., 1965 - Konstanz, Wechsel und Typus des Determination und Differenzierung in Zellen aus männlichen genitalanlagen von Drosophila melanogaster nach Dauerkultur in vivo.
Dev. Biol., 13, 424-509.

HAGET A., 1953 - Analyse expérimentale des facteurs de la morphogenèse embryonnaire chez le Coléoptère Leptinotarsa.
Bull. Biol. Fr. Belg., 87, 123-217.

HALPERN B., 1969 - Synthèse cellulaire et structure moléculaire des immunoglobulines.
Dunod, 1969.

HARDY, LEM BOON, KENG, 1894 - On the change in the number and character of the wandering cells of the frog induced by the presence of urari or of Bac. anthracis.
J. Phys. Cambridge, 15, 361-375. Cité par Mesnil.

HARRIS M., 1941 - The establishment of tissue specificity in tadpoles of Hyla regilla.
J. Exp. Zool., 88, 373-397.

HARRISON R.G., 1924 - Heteroplastic transplantation of limbs.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 10, 69. Cité par Loeb.

HARRISON R.G., 1925 - Heterotransplants of eye in Ambystoma.
Anat. Rec., 31, 289. Cité par Loeb.

HAY E.D., 1966 - Regeneration. Biological studies.
Holt, Rinehart Winston, 148 p.

HAURCWITZ F., 1967 - The evolution of selective and instructive theories of antibody formation.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, Antibodies, 559-567.

HAURCWITZ F., 1968 - Immunochemistry and the biosynthesis of antibodies.
Interscience publishers, J. Whiley and sons, New-York, 301 p.

HEGE S.S., COLE L.J., 1967 - Antibody plaque forming cells in unsensitized mice. Specificity and response to neonatal thymectomy, X irradiation, and P.H.A.
J. Immunol. U.S.A., 99, 61-70.

HERNER A.E., FRIEDEN E., 1960 - Biochemistry of anuran metamorphosis. VII. Change in serum protein during spontaneous and induced metamorphosis.
J. Biol. Chem. U.S.A., 235, 2845-2851.

HILDEMANN W.H., HAAS R., 1959 - Homotransplantation and tolerance in bullfrog.
J. Immunol. U.S.A., 83, 478-485.

HILDEMANN W.H., HAAS R., 1961 - Histocompatibility genetics of bullfrog population (Rana catesbiana).
Evolution U.S.A., 15, 267-271.

HILDEMANN W.H., HAAS R., 1962 - Developmental changes in leukocytes in relation to immunological maturity. Mechanisms of immunological maturity. Mechanisms of immunological tolerance.
Symp. Liblice/Prague, 35-49.

HILDEMANN W.H., 1962 - Immunogenetics studies of poïkilothermics animals.
Ann. Nat., 46, 204.

HILDEMANN W.H., COOPER E.L., 1963 - Immunogenesis of homografts reactions in fishes and amphibians.
Feder. Proc., 22, 1145-1151.

HILDEMANN W.H., THOENES G.H., 1969 - Immunological responses of Pacific Hagfish. I. Skin transplantation immunity.
Transplantation, 7, 506-521.

HILSCHMANN N., CRAIG L.C., 1965 - Aminoacid sequence studies with Bence Jones proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 53, 1403.

HINK W.F., BRIGGS S.D., 1968 - Bacterial factors in haemolymph from normal and immune wax moth larvae : Galleria mellonella.
J. Ins. Phys., 14, 1025-1034.

HINK W.F., 1970 - Transplantation in Arthropods.
Symposium "Phylogeny of Transplantation Immunity".
Los Angeles, 29-30 janvier 1970, sous presse.

HOROWITZ N.H., 1939 - Tissue reaction to transplantation of muscle in Triturus viridescens.
J. Exp. Zool., 76, 105.

HORTON J.D., 1969 - Ontogeny of the immune response to skin allografts in relation to lymphoïd organs development in the amphibian Xenopus laevis Daudin.
J. Exp. Zool., 170, 449-466.

HOUILLON C., 1967 - Greffes embryonnaires de peau entre Ambystoma mexicanum Shaw, Pleurodeles walthii Michah et Triturus alpestris Laur; phénomènes de tolérance et de rejet.
C.R. Acad. Sci. Paris, 264, 834-837.

HUCHON D., 1962 - Degré de tolérance de la greffe en parabiose chez les amphibiens.
C.R. Acad. Sci. Paris, 255, 3232-3234.

HUMPHREY J.H., 1962 - La tolérance acquise et la tolérance naturelle à l'égard de substances antigéniques définies.
Colloque du C.N.R.S., Royaumont 1962, 401-409.

HUMPHREY J.H., WHITE R.G., 1964 - Immunology for students of medecine.
Blackwell scientific publication. Orford. 498 p.

INGRAHAM J.S., 1963 - Identification individuelle des cellules productrices d'anticorps par une réaction hémolytique locale.
C.R. Acad. Sci. Paris, 256, 5005-5008.

INGRAHAM J.S., BUSSARD A.E., 1964 - Application of a localized hemolysin reaction for specific detection of individual antibody forming cells.
J. Exp. Med., 119, 667-682.

JACHERTS D., 1967 - Antikörpersynthese in vitro. VII. Uber die Wirkung informatischer RNS Moleküle in zellfreien Systemen aus Milzzellen.
Zs. Mikrobiol. u. Immunol., 153, 250-268.

JANKOVIC B.D., ARNASON P.D., WAKSMAN B.H., 1963 - "Immunological capacity of the thymectomized rat".
In Tolérance acquise, tolérance naturelle à l'égard de substances antigéniques définies. A. Bussard ed. Paris C.N.R.S., 387-389.

JERNE N.K., 1955 - The natural selection theory of antibody formation.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 41, 849-857.

JERNE N.K., NORDIN A.A., HENRY C., 1963 - The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells.
In "Cell - bound antibodies", edited by B. Amos, H. Koproski. Wistar inst. Press, 109-125.

JERNE N.K., 1970 - The generation of self tolerance and of antibody diversity. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. Sous presse.

JORDAN H.E., SPEIDEL J.C., 1923 - Blood cell formation and distribution in relation to the mecanism of thyroid accelerated metamorphosis in larval frog.
J. Exp. Med., 38, 525-541.

JORDAN H.E., SPEIDEL C.C., 1924 - Studies on lymphocytes. III. Granulocyto-poiesis in the Salamander with reference to the monophyletic theory of blood cell origin.
An. J. Anat., 33, 485-505.

KABAT E.A., MAYER M.M., 1964 - Experimental immunochemistry. C.C. Thomas, Springfield, Illinois.

KAPA E.A., 1963 - Histological and histochemical analysis of the thymus in tailless amphibians.
Acta Morphol. Acad. Sci., Hungar ., 12, 1-8.

KELLY L.S., DOBSON E.L., FINNEY C.R. , HIRSCH J.D., 1960 - Proliferation of the reticuloendothelial system in the liver.
Am. J. of Physiology, 198, 1134-1138.

KENNEDY J.C. , TILL J.E., SIMINOVITCH L., MAC CULLOCH E.A., 1966 - The proliferative capacity of antigen sensitive precursors of hemolytic plaque forming cells.
J. Immunol., 96, 973.

KOWALEWSKY , 1883 - Etudes expérimentales sur les glandes lymphatiques des invertébrés.
Bull. Acad. Imp. Sci. St-Pétersbourg, 13, 437. (Cité par Mesnil).

KRUEGER R. G., TWEDT R. M., 1963 - Cellular demonstration of antibody production in Rana pipiens.
J. Immunol. U.S.A., 90, 952-955.

LANDSTEINER K., LAMPL H. , 1918 - Ueber die Abhaengigkeit der Serologischen Specificitaet von der chemischen Struktur.
Biochem. Zs., 86, 343.

LANDSTEINER K., 1946 - The specificity of serological reaction.
Harv. Univ. Press, Cambridge.

LASKOV R., 1968 - Rosette forming cells in non immun ized mice.
Nature, G.B., 210, 973-975.

LE DOUARIN N., 1966 - L'hématopoièse dans les formes embryonnaires et jeunes de Vertébrés.
Ann. Biol., 5, 119.

LEGLER D.W., EVANS E.E., 1966 - Hemolytic complement in Amphibia.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 161, 1158-1162.

LEWIN J., HILLION P., 1956 - Fixation et coloration des électrophorégrammes.
Ann. Biol. Clin., 10-12, 22-37.

LOEB L., 1945 - The biological basis of individuality.
C. Thomas ed., Springfield, Illinois.

LUK'JANENKO V.I., SUKACHEVA G.A., POPOV A.V. , 1968 - Etude expérimentale de l'immunisation de poissons par administration de sérum pris comme antigène (en russe).
Izvest. Akad. Nauk. S.S.S.R., Ser. Biol., 5, 761-763.

LYKAKIS J.J., 1968 - Immunoglobulin production in the european pond tortoise, Emys orbicularis immunized with serum protein antigen.
Immunology, G.B., 14, 799-808.

LYKAKIS J.J., 1969 - The production of two class of antibody in toad Xenopus laevis, homologous with mammalian M (19 S) and G (7 S) immunoglobulins.
Immunology, 16, 91-98.

MAC KAY D., JENKIN C.R., 1969.- Immunity in invertebrates. II. Adaptive immunity in the crayfish (Parachaeraps bicarinatus).
Immunology, 17, 127-137.

MAGE R.G., 1967 - Quantitative studies on the regulation of expression of genes for immunoglobulin allotypes in heterozygous rabbits.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, Antibodies, 203-210.

MAGNIN E., 1960 - Anatomie du têtard d'Alytes obstetricans.
Act. Soc. Linn. Bordeaux, 98, 33-63.

MAKELA C., 1965 - Single lymphnode cells producing heteroclitic bacteriophage antibody.
J. Immunol., 95, 378.

MAKELA C., 1967 - The specificity of antibodies produced by single cells.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, 423-430.

NANNING N.J., HORTON J.D., 1969 - Histogenesis of lymphoid organs in larvae of the South African clawed toad, Xenopus laevis (Daudin).
J. Embryol. exp. Morph., 22, 265-277.

MARCHALONIS J.J., EDELMAN G.M., 1966 - Phylogenetics origins of antibody structure. II. Immunoglobulins on the primary immune response of the bullfrog Rana catesbiana.
J. Exp. Med., 124, 901-913.

MARCHALONIS J.J., 1968 - Studies on the evolution of antibody structure.
Dissert. Abstrac. E. U.S.A., 29, 46-47.

MASON-SMITH A., POTTER M., BRUCE-MERCHANT E., 1967 - Antibody forming cells in the pronephros of the teleost Lepomis macrochirus.
J. of Immunol., 99, 876-882.

MAXIMOW A., 1910 - Uber embryonal Entwicklung des Blutzellen bei Selachieren und Amphibien.
Anat. Anz., Bd. a 37, 64-70.

MESNIL F., 1895 - Sur le mode de résistance des vertébrés inférieurs aux invasions microbiennes artificielles.
Thèse Sci., Paris, 63 pages.

METCHNIKOFF E., 1884 - Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrand Bacillen.
Virchow's Archiv, 97, 502-507.

MILLER J.F.A.P., 1962 - Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse.
Proc. Roy. Soc. B., 156, 415.

MILLER J.F.A.P., MOREMAN K.G., 1963 - The role of the thymus in immunity.
Med. Biol. Ill., 13, 34.

MILLER J.F.A.P., 1963 - Rôle du thymus dans les processus immunitaires.
Ann. Inst. Pasteur, 105, 1008-1016.

MILLER J.F.A.P., MAC INTIRE K.R., SELL S., 1965 - The role of the thymus in the development of immunological competence.
In La greffe des cellules hématopoiétiques allogéniques.
C.N.R.S. ed., Paris, 1965, 105-108.

MILLER J.F.A.P., DE BURGH F.M., GRANT G.A., 1965 - Thymus and the production of plaque forming cells.
Nature, 208, 1332-1334.

MILLER J.F. A.P., MITCHELL G.F., 1967 - The thymus and the precursors of antigen reactive cells.
Nature, 216, 659-663.

MILLER J.F.A.P., MITCHELL G.F., WEISS N.S., 1967 - Cellular basis of immunological defects in thymectomized mice.
Nature, 214, 992-997.

NAIRN R.C., 1964 - Fluorescent protein tracing.
Livingstone, 335 p.

NORTANICOLA L., 1959 - Trapianti larvale di membra di Bufo vulgaris negli Bufo viridis .
Arch. Sci. Biol. Ital., 43, 396-406.

NOSSAL G.J.V., AUSTIN C.M., PYE J., MITCHELL G.F., 1966 - Antigen in immunity. Antigen trapping in the spleen.
Int. Arch. All. App. Imm., 29, 368-383.

NOSSAL G.J.V., SHORTMAN K.D., MILLER J.F.A.P., MITCHELL G.F., HASKILL J.S., 1967 - The target cell in the induction of immunity and tolerance.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, Antibodies, 369-379.

OSOBA D., MILLER J.F.A.P., 1963 - Evidence for a humoral thymus factor responsible for the maturation of immunological faculty.
Nature, 199, 653-654.

OSOBA D., MILLER J.F.A.P., 1964 - The lymphoid tissues and immune responses of neonatally thymectomized mice bearing thymus tissue in millipore chambers.
J. Ex. Med., 119, 177.

OSOBA D., 1969 - Restriction of the capacity to respond to two antigens by single precursors of antibody producing cells in culture.
J. Exp. Med., 129, 141.

OUCHTERLONY O., 1962 - Diffusion in gel methods for immunological analysis II.
Prog. All., 6, 30-154.

OUDIN J., 1952 - Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis.
In A.C. Corcoran (ed) : Methods in medical Research. Yeark Book Publishers, Chicago, 1952, vol. 5, p. 335.

CUDIN J., 1968 - L'hétérogénéité des immunoglobulines telle qu'elle est révélée par leurs trois sortes de spécificités antigéniques, isotypiques, allotypiques, idiotypiques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 965-990.

PAPERMASTER B.W., CONDIE R.M., FINSTAD J.K., GOOD R.A., GABRIELSEN A.E., 1963 - Phylogenetic development of adaptative immunity.
Fed. Proc., 22, 1151-1155.

PAPERMASTER B.W., 1967 - The clonal differentiation of antibody producing cells.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, Antibodies, 447-460.

PASSALACQUA A., 1952 - Compatibilita e incompatibilita embrionali in espianti etero e xenoplastici.
Ric. Sci. Ital., 22, 1224-1227.

PERNIS B., 1967 - Relationships between the heterogeneity of immunoglobulins and the differentiation of plasma cells.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, Antibodies, 333-341.

PETERSEN B.H., INGRAHAM J.S., 1969 - The limitation of individual cells to the production of a single specificity of antibody in response to a coupled hapten antigen complex.
Immunochemistry, 6, 379-390.

PIZZARELLO D.J., WOLSKY A., 1958 - Sex relationship in tissue transplantation in the newt, Triturus viridescens.
Anat. Rec., 131, 589.

PIZZARELLO D.J., WOLSKY A., 1960 - Sexual dimorphism in the histocompatibility reactions of Amphibia to skin homografts and a tentative explanation of their mechanism.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 87, 45-54.

PLAYFAIR J.H., PAPERMASTER B.W., COLE L.J., 1965 - Focal antibody production by transferred spleen cells in irradiated mice.
Science, 149, 998.

POLLARA B., SURAN A., FINSTAD J., GOOD R.A., 1968 - N. Terminal aminoacid sequences of immunoglobulins chains in Polyodon spattula.
Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A., 59, 1307-1312.

POLLICITA M., 1953 - Resulti nella parabiosi xenoplastica Triton i Discoglossus.
Ric. Sci. Ital., 10, 1802-1804.

ROSSI A., 1956 - Sulla incompatibilita larvale tardiva nei trapianti xenoplastici di Urodeli su Anuri.
Atti Acad. Nazion. Lincei. R.C. cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Ital., 18, 130-135.

ROSSI A., 1958 - Sull'incompatibilita larvale nei tropianti xenoplastici di urodeli su anuri. Processi degenerativi delle code di Triton taeniatus trapiantate nel campo dell'arto posteriore di Discoglossus pictus e di Hyla arborea.
Atti. Acad. Nazion. Lincei. R.C. cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Ital., 24, 193-200.

SCHWAB G.E., REEVES P.R., 1966 - Comparison of the bactericidal activity of different vertebrates.
J. Bact., 91, 106-112.

SCHULTZ W., 1918 - Transplantation and hybridization.
Arch. f. Entwicklungsmech., 43, 361.

SERRE A., THEODOR J., 1967 - Mise en évidence d'une reconnaissance immunologique des tissus chez un Invertébré.
C.R. Acad. Sci. Paris, 264, 513-514.

SETO F., HENDERSON W.G., 1969 - Natural and immune hemagglutinin forming capacity of immature chicken.
J. Exp. Zool., 169, 501-511.

SIDKY Y.A., AUERBACH R., 1968 - Tissue culture analysis of immunological capacities of snapping turtles.
J. Exp. Zool., 167, 187-196.

SILVERSTEIN A.M., KRANER K.L., 1965 - The role of circulating antibody in the rejection of homografts.
Transplantation U.S.A., 3, 535-541.

SIMNETT J.D., 1964 - Histocompatibility in the platanna Xenopus laevis (Daudin) following nuclear transplantation.
Exp. Cell. Res., 33, 232-239.

SIMNETT J.D., 1965 - The prolongation of homograft survival time in the Platanna Xenopus laevis (Daudin) by exposure to low environmental temperature.
J. Cell. Comp. Physiol., 65, 293-298.

SIMNETT J.D., 1969 - Factors influencing the differentiation of amphibian embryos implanted into homologous immunologically competent hosts (Xenopus laevis).
Devl. Biol., 13, 112-143.

SIMONSEN M., 1967 - The clonal selection hypothesis evaluated by grafted cells reacting against their hosts.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 32, Antibodies, 517-523.

SIROTININ N.N., 1960 - A comparative physiological study of the mechanisms of antibody formation.
Proc. Symp. Mechan. of Antibody Formation. Pub. House Czech. Acad. Sci. Prague, 113.

SOLOMON J.B., 1965 - Onset and nature of the immune response to heterologous erythrocytes in embryo and young chicks.
In The molecular and cellular basis of antibody formation.
J. Sterzl et al.eds. Publ. House Czech. Acad. Sci., 371-379.

SOLOMON J.B., 1968 - Ontogeny of cells producing haemolytic antibody or immuno-cyto-adherence to sheep red blood cells in the chicken.
Immunology, 14, 611-619.

SPEIRS R., 1960 - Production of antibody in reticulo-endothelial system initiated by eosinophils.
In Third internation. symp. reticulo-endothelial struct.Funct. Rapallo, Italy, N.Y. Ronald Press, 113-142.

STERZL J., RIHA I., 1965 - Detection of cells producing 7 S antibodies by the plaque technique.
Nature, 208, 858.

STERZL J., SILVERSTEIN A.M., 1967 - Developmental aspects of immunity.
Advances in Immunology, 6, 337-459.

STORB U., BAUER W., STORB R., FLIEDNER T.M., WEISER R.S., 1969 - Ultrastructure of rosette-forming-cells in mouse during the antibody response.
J. Immunol., 102, 1474-1485.

SURAN A.A., PAPERMASTER B.W., 1967 - N. terminal sequence of heavy and light chains of leopard shark immunoglobulins : evolutionary implications.
Proc. Nat. Acad. Sci., 58, 1619-1623.

TAUBE E., 1920 - Transplantation of Amphibian skin. I.
Arch. f. Entwicklgsmech., 98, 98. Cité par Loeb.

TAUBE E., 1921 - Ibid. , 49, 270. Cité par Loeb.

THEODOR J., 1966 - Contribution à l'étude des gorgones. Les greffes chez les gorgones : étude d'un système de reconnaissance de tissus.
Bull. Inst. Océan. Monaco , 66, 1-7.

THIERY J.P., 1968 - In Discussion du colloque d'immunochimie, Paris, 8-9 XII 1967. Bull.Soc.Chim.Biol., 50, 1191.

TISELIUS A., 1937 - Electrophoresis of purified antibody preparations.
J. Exp. Med., 65, 641.

TITANI K., WHITLEY Jr E., AVOGARDO L., PUTNAM F.W., 1965 - Immunoglobulin structure : partial aminoacid sequence of a Bence-Jones protein.
Science, 149, 1090.

TOURNEFIER A., 1968 - Etude histologique des hétérogreffes embryonnaires de tégument chez les amphibiens urodèles.
Bull. Soc. Zool. France, 93, 99-108.

TRNKA Z., FRANEK F., 1960 - Studies on the formation and characteristics of antibodies in frogs.
Folia Microbiol., 5, 374-380.

TURNER R.J., 1969 - The functional development of the reticulo-endothelial system in the toad Xenopus laevis.
J. Exp. Zool. 170, 467-480.

TYAN M.L., COLE L.J., HERZENBERG L.A., 1968 - Fetal liver : a source of specific immunoglobulin production in radiation chimaeras.
In Adv. Transplant. Proc. 1rst Int. Cong. Paris, 87-89.

TYAN M.L., HERZENBERG L.A., 1968 - Studies of the mouse immune system. II. Immunoglobulin producing cells.
J. Immunol. U.S.A., 101, 446-450.

VALEMBOIS P., 1962 - Etude anatomique et physiologique de l'évolution des greffons hétéroplastiques de paroi du corps chez quelques Lombriciens.
Thèse de 3ème Cycle, Bordeaux.

VALEMBOIS P., 1963 - Recherches sur la nature de la réaction antigreffe chez le Lombricien Eisenia fœtida Sav.
C.R. Acad. Sci. Paris, 257, 3489-3490.

VALEMBOIS P., 1970 - Etude d'une hétérogreffe de paroi du corps chez les Lombriciens. Aspects cytologiques et physiologiques de l'évolution du greffon (Allolobophora caliginosa Dugès) et de la réaction du porte-greffe (Eisenia fœtida Sav.).
Thèse Doctorat ès sciences, Bordeaux.

VER ECKE A., 1899 - Structure et modifications fonctionnelles du thymus de la grenouille.
Bull. Acad. Roy. Méd. Belgique, 13, 67-86.

VOGEL H.H., 1940 - Transplantation of autogenous and homoiogenous skin in adult Rana pipiens.
J. Exp. Zool., 85, 437.

VOLPE E.P., 1964 - Fate of neural crest homotransplants in pattern mutant of the leopard frog.
J. Exp. Zool., 157, 179-196.

VOLPE E.P., GEBHARDT B.M., 1965 - Effect of dosage on the survival embryonic homotransplants in the leopard frog Rana pipiens.
J. Exp. Zool., 160, 11-28.

VOLPE E.P., 1970 - In Phylogeny of Transplantation Immunity.
Los Angeles, january 1970, in press.

VRIES de J.M., VAN BEKKUM D.W., VAN PUTTEN L.M., VAN DER WAAIJ D., BALNER H., 1965 - Signs of autoimmune reactivity in neonatally thymectomized mice.
In La Greffe des cellules hématopoïétiques allogéniques.
C.N.R.S. ed., 115-118.

VYAZOV C.E., SORCKINA N.N., 1962 - Attempt to induce acquired tolerance in amphibians.
Proc. Symp. Mechanisms of immulogical tolerance, Liblice/ Praque. Pub. House Czechosl. Acad. Sci., 175-178.

WIDAL et SICCARD, 1897 - Influence de l'organisme sur les propriétés acquises par les humeurs du fait de l'infection chez quelques animaux à sang froid.
C.R. Soc. Biol., 4, 1047-1050.

WOLLMAN E., 1938 - Recherches immunologiques sur les animaux inférieurs.
Rev. Immunol., 4, 101-110.

YI-CHUAN-CHING, WEDGWOOD R.J., 1967 - Immunologic response in the Axolotl.
J. Immunol. U.S.A., 99, 191-200.

YOFFEY J.M., 1960 - The lymphomyeloid complex.
In Ciba foundation symposium Hemopoiesis. Churchil ed., 1-42.

ZAALBERG O.B., 1964 - A simple method for detecting single antibody forming cells.
Nature (Lond.), 202, 1231.

==========

LISTE DES ABREVIATIONS

A.I.E. : Analyse immuno-électrophorétique.

C.F.P. : Cellule formant une plage de lyse.

C.F.P. naturelle : Cellule formant une plage de lyse chez l'animal non immunisé.

C.F.R. : Cellule formant une rosette.

C.F.R. naturelle : Cellule formant une rosette chez l'animal non immunisé.

G.R.H. : Globule rouge humain.

G.R.M. : Globule rouge de mouton.

I.C.A. : Immuno - cyto - adhérence.

IgG : Immunoglobuline gamma. (Constante de sédimentation : 7 Unités Svedberg, 7 S).

IgM : Immunoglobuline macroglobuline (19 S).

Vu et approuvé

Bordeaux, le